

Avaliação da atividade antifúngica de quitinases de macieira

Andreia Sofia Pereira Cabanas

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Co-orientador: Licenciada Maria Cecília Nunes Farinha Rego

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Ana Paula Ferreira Ramos, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho foi imprescindível a colaboração de várias pessoas, a quem passo a agradecer:

Em primeiro lugar à minha orientadora, Dr.^a Mariana Mota, por me ceder a oportunidade de trabalhar com as suas quitinases, pelo incentivo e motivação constante, pelo carinho e amizade com que orientou este trabalho. Muito Obrigada!

À Investigadora Cecília Rego, co-orientadora deste trabalho, agradeço a sua disponibilidade na leitura e revisão do manuscrito, bem como o apoio dado ao longo deste trabalho.

Ao mestre e amigo Pedro Reis, por me auxiliar nos ensaios de inibição e leitura desta dissertação, pelo companheirismo, convívio e apoio, pelo bom ambiente que proporcionou tanto no laboratório como nos intervalos, e especialmente pela amizade que me concedeu.

À mestre Tânia Genebra, agradeço a disponibilidade e ajuda nos ensaios de secretomas.

À Sra. Nídia pela companhia e boa disposição no laboratório.

A todos os funcionários do Laboratório de Patologia Vegetal “Veríssimo de Almeida” pela colaboração prestada.

À Ana Costa, Marta Rocha, Inês Diniz, Tatiana, Sara Belchior e Engenheira Filomena Caetano pelo companheirismo, simpatia e amizade com que me receberam.

À amiga Ana Geraldês, pela companhia, carinho, amizade ao longo do curso e por tudo o que me ensinou.

À Raquel, por ter sido tão importante no meu percurso académico e pela amizade de sempre.

Aos meus amigos Sofia, Paulo, Maria e Sara pela amizade, companheirismo, ajuda e motivação ao longo do curso e em especial nesta etapa final.

A todos os meus amigos, o meu muito obrigada.

À minha Família por serem o meu pilar,

Em especial, ao João, o meu irmão, por ser o meu melhor amigo e acreditar sempre em mim, e aos meus pais, por tudo o que me ensinaram, pelos valores transmitidos, pela compreensão e apoio constante.

Muito Obrigada a todos!

RESUMO

A utilização de quitinases como substâncias antifúngicas revela interesse, já que a quitina é um importante constituinte das paredes dos fungos. Este trabalho visou a expressão em levedura *Pichia pastoris* de genes codificadores de quitinases ácidas de macieira de classe III, anteriormente isolados e clonados, e avaliação da eficácia fungicida das proteínas recombinantes correspondentes. Foram expressas diferentes construções com três genes de quitinases (C525, C209, C203) clonados nas estirpes GS115 e KM71H, em meio metanólico a 30°C com agitação, medindo-se o crescimento da cultura e o teor de proteína periodicamente. Os secretomas obtidos foram dialisados, liofilizados, filtrados e utilizados em ensaios de eficácia biológica de inibição micelial e de germinação de esporos de *Botrytis cinerea*, inicialmente a 20°C e com 1 mg de proteína na solução inicial. Analisaram-se as duas estirpes, variando-se a temperatura do ensaio e a quantidade de proteína utilizada inicialmente (para 2,5 mg). A produção de secretomas revelou-se mais eficaz na estirpe GS115H durante 120 h e 144 h. A construção que mostrou maior eficácia em inibição micelial foi C209 EN em GS115. Realizaram-se também ensaios com *Ilyonectria macrodydima*, *Stemphylium* sp. e *Venturia inaequalis*, tendo sido observado alguma inibição da construção C203EN sobre *Stemphylium* sp.

Palavras-chave: quitinase, fungicida, eficácia biológica, *Pichia pastoris*, *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

This work focused on the expression of cloned heterologous chitinase genes in order to produce the corresponding recombinant proteins. Constructs harbouring the three chitinase genes (C525, C209, C203) cloned in GS115 and KM71H strains were expressed in culture medium with methanol as carbon source at 30°C. Culture growth and total soluble protein content were assessed periodically. The resulting secretomes were dialysed, freeze-dried and used in assays of biological efficacy regarding inhibition of mycelial growth and spores germination of *Botrytis cinerea*. First assays were conducted at 20°C with 1 mg of total protein in the initial solution. Both strains were analysed, varying also the temperature and the amount of protein assayed (to 2.5 mg). Secretome production was more efficient in the strain GS115H during 120 h and 144 h. The construct that showed higher efficacy in the biological assays was the C209 EN cloned in GS115. Assays with *Ilyonectria macrodydima*, *Stemphylium* sp. and *Venturia inaequalis*, were also conducted and showed some inhibition potential of construct C203EN towards *Stemphylium* sp.

Keywords: chitinase, fungicide , biological effectiveness, *Botrytis cinerea*, *Pichia pastoris*

EXTENDED ABSTRACT

The most important limitations to apple culture in Portugal are the phytopathogens, that affect strongly fruit quality and yield when they are not strictly controlled by repeated application of pesticides. However, frequent spraying with pesticides originates, besides high costs, also important ecological problems and consumer health concerns, in fruit production and shows the interest of assessing alternative fungicides that may be less harmful for environment and human health, like plant-derived substances. PR-proteins isolated from apple can constitute good candidates to use as natural fungicides in apple orchards. Chitin, being a structural component of organisms responsible for many diseases and plagues, led to an interest to investigate enzymes with the capacity to degrade them, towards developing biopesticides. Chitinases are enzymes that hydrolyze the N-acetylglucosamine polymer chitin, and occur in a wide range of organisms. They are reported to play a protective role against fungal pathogens. Therefore formulations based on chitinases, enzymes that hydrolyze chitin, offer potential biocontrol agents.

Sequences of three different genes encoding class III chitinases, with deduced protein sequences showing a primary structure similar to the chitinase isolated from *Rhizopus oligosporus* that has confirmed antifungal activity were previously isolated and cloned in *Pichia pastoris*. This work focused on the expression of these cloned heterologous genes in order to produce the corresponding recombinant proteins. Constructs harbouring the three chitinase genes (C525, C209, C203) cloned in GS115 and KM71H strains were expressed in culture medium with methanol as carbon source at 30°C. Culture growth and total soluble protein content were assessed periodically. The resulting secretomes were dialysed, freeze-dried and used in assays of biological efficacy regarding inhibition of mycelial growth and spores germination of *Botrytis cinerea*. First assays were conducted at 20°C with 1 mg of total protein in the initial solution. Both strains were analysed, varying also the temperature and the amount of protein assayed (to 2.5 mg). Secretome production was more efficient in the strain GS115H during 120 h and 144 h. The construct that showed higher efficacy in the biological assays was the C209 EN cloned in GS115. Assays with *Ilyonectria macrodydima*, *Stemphylium* sp. and *Venturia inaequalis*, were also conducted and showed some inhibition potential of construct C203EN towards *Stemphylium* sp.

Future work shall consider the evaluation of the GS115 secretome harbouring the C209EN construct in assays with other fungi and also in planta. It will also be interesting to analyse the potential effect in combination with a fungicide and as insecticide. It is of extreme importance that this work is carried out with support of biochemical data. Large scale production of proteins is needed in order to allow the purification of the recombinant

chitinase and its use, instead of crude secretome, in biological and in *in vitro* chitinolytic assays.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
EXTENDED ABSTRACT	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE QUADROS	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A utilização de fungicidas	3
2.1.1 Enquadramento sobre o aparecimento de fungicidas	3
2.1.2 Tipos e funções dos fungicidas.....	3
2.1.3 Vias metabólicas afetadas pelos fungicidas	4
2.1.4 Novas moléculas antifúngicas	5
2.2 Quitinases de Macieira	6
2.2.1 Proteínas PR (<i>Pathogenesis-Related</i>)	6
2.2.2 Definição e classificação	7
2.2.3 Substratos de quitinase e sua ocorrência e estrutura	9
2.2.4 Regulação e expressão das quitinases	11
2.2.5 Funções de quitinases.....	13
2.2.6 Atividade quitinolítica e seu interesse agronómico	16
2.3 Produção de quitinases e sua utilização.....	18
2.3.1 Produção direta em plantas e fungos	18
2.3.2 Produção indireta	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material	22
3.1.1 Fungos em estudo.....	22

3.1.2 Estirpes de levedura <i>Pichia pastoris</i>	26
3.1.3 Construções genéticas para síntese de proteínas	26
3.2 Preparação dos secretomas contendo as quitinases a testar	27
3.2.1 Indução da síntese de quitinases de macieira	27
3.2.2 Diálise do secretoma	29
3.2.3 Liofilização do secretoma	30
3.2.3 Filtração do secretoma	30
3.2.4 Quantificação proteica	31
3.3 Ensaios de eficácia biológica de secretomas com quitinases ácidas de macieira	31
3.3.1 Inibição do crescimento micelial	31
3.3.2 Inibição da germinação de esporos	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Produção de Secretomas	38
4.2 Eficácia biológica de secretomas com quitinases ácidas de macieira	43
4.2.1 Ensaios de inibição micelial	43
4.2.2 Ensaios de inibição de germinação de esporos	51
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ANEXOS	59
ANEXO 1: Composição do meio de malte.....	59
ANEXO 2: Sequências isoladas de DNA genómico das isoformas C525, C203, C209 ..	60
ANEXO 3: Representação esquemática das construções, com respetivos locais de restrição: Ecol+NotI e XhoI+NotI (Sousa, 2011).....	61
ANEXO 4: Plasmídeo pPICZα: construções EN(Ecol+NotI) e XN (XhoI+NotI) (Sousa, 2011).....	62
ANEXO 5: Meios para crescimento de leveduras.....	63
ANEXO 6: Protocolo de preparação das membranas de diálise.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelação por homologia do enzima quitinase ácido da classe III de macieira, codificado pelo gene <i>Chi1</i> . Estrutura em <i>ribbon</i> . Programa SPDB Viewer.....	11
Figura 2: Esquema da parede celular de um fungo. GPI – glycophosphatidylinositol	17
Figura 3: Levedura <i>Pichia pastoris</i>	21
Figura 4: <i>Botrytis cinerea</i> a) ampliação 400x; b) Crescimento do micélio do fungo em PDA - dois dias à temperatura de 20°C (original da autora).....	23
Figura 5: <i>Ilyonectria macrodydima</i> , isolado Cy244: a) ampliação 1000x (Fonte:Reis (2010); b) crescimento micelial em PDA – cinco dias à temperatura ambiente (original da autora).	24
Figura 6: <i>Stemphylium</i> sp., crescimento de uma colónia em PDA – cinco dias à temperatura ambiente (original da autora).....	25
Figura 7: Esquema da mudança de meios de crescimento.	28
Figura 8: Esquema da produção de leveduras em cultura líquida.	29
Figura 9: Diálise	29
Figura 10: Liofilizadores a) b) Hetto Drywiner F.D 1.0-60E	30
Figura 11: Filtração	30
Figura 12: Reagente de Bradford	31
Figura 13: Esquema de preparação do método do meio tóxico utilizado e respetivas concentrações para 10 mg L ⁻¹ (Adaptado de:Farropas (2003)).....	33
Figura 14: Marcação dos discos miceliais num isolado de <i>Ilyonectria</i> (original da autora).	34
Figura 15: Esquema do procedimento semelhante ao usado no ensaio da inibição da germinação de esporos de <i>Botrytis cinerea</i> (Fonte: Farropas,2003).....	37
Figura 16: Ensaio de inibição micelial GS9 com <i>B. cinerea</i> (Construção GS C209 EN)	46
Figura 17: Eficácia de diferentes concentrações do secretoma (em mg de proteína /mL) GS C209 EN (IV,96h) utilizada no ensaio GS9 de inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de <i>Botrytis cinerea</i> . Reta de regressão linear, respetiva equação e coeficiente de determinação (R ²).	47
Figura 18: Esquema dos ensaios de inibição micelial válidos.....	50

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Diferenças entre quitinases das famílias 18 e 19 de glicosidades adaptado de Kasprzewska (2003).....	9
Quadro 2: Funções das quitinases	15
Quadro 3: Funções de quitinases apoplásticas e vacuolares na patogénese	18
Quadro 4: Características importantes dos fungos em estudo.....	25
Quadro 5: Estirpes de <i>Pichia pastoris</i> utilizadas neste estudo.....	26
Quadro 6: Construções das proteínas testadas e respetiva notação	27
Quadro 7: Secretomas produzidos para os ensaios de eficácia biológica – inibição micelial.	38
Quadro 8: Valores máximos de proteína (mg/mL) e respetiva construção, obtidos por estirpe	41
Quadro 9: Ensaio de produção de secretomas finais (produzidos pela autora)	42
Quadro 10: Ensaio de Inibição micelial realizados.....	44
Quadro 11: Percentagens de inibição micelial dos ensaios realizados com o fungo <i>Botrytis cinerea</i>	45
Quadro 12: Parâmetros de Regressão linear (R^2 e b) e valores de CE_{50} teoricamente registados nos ensaios com o fungo <i>Botrytis cinerea</i> , <i>in vitro</i> , para 1 mg de proteína e estirpe GS115.	47
Quadro 13: Percentagens de inibição micelial dos ensaios realizados com os fungos <i>Ilyonectria macrodydima</i> e <i>Stemphylium</i> spp.....	49

Lista de Abreviaturas

BMGY - Meio tamponado complexo com Glicerol

BMMY - Meio tamponado complexo com Metanol

KM - KM71H

OD - Densidade ótica

PDA - Gelose de Batata dextrosada

GlcNAc - N-acetilglucosamina

GS - GS115

PR - *pathogenesis related*

1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos em plantas são uma das maiores preocupações na produção agrícola. A prática mais comum de resolução deste problema remete-se essencialmente ao uso de compostos químicos, conduzindo a efeitos adversos no meio ambiente, bem como riscos na saúde humana e em organismos não alvo (Gohel *et al.*, 2006). A limitação de meios disponíveis no combate a problemas relacionados com fungos, e o uso de luta química como via exclusiva são desafios a superar através do estudo de alternativas. Os principais produtos aplicados são fungicidas, que representam cerca de 69% (em volume de vendas) dos produtos fitofarmacêuticos comercializados em Portugal (DGADR, 2011).

Em culturas com importância económica e expressão a nível nacional e global como é o caso da macieira, muitos dos problemas fitossanitários que surgem envolvem a aplicação de 15-20 tratamentos por ano (Broggini *et al.*, 2011). Uma consideração importante para o desenho de estratégias de uso de fungicidas é a preocupação de desenvolvimento de resistência a fungicidas, que conduz à perda da sua eficácia biológica. Este aspeto, aliado à crescente preocupação com os efeitos na saúde humana e contaminação ambiental resultantes da aplicação de produtos fitofarmacêuticos, tem conduzido ao desenvolvimento de novas estratégias no âmbito da proteção de plantas, nomeadamente no ramo da biotecnologia.

A quitina, sendo um componente estrutural de organismos responsáveis por muitas das doenças e pragas, conduziu ao interesse e investigação de enzimas com a capacidade de a degradar, no sentido de desenvolver biopesticidas.

O tema desta dissertação insere-se no âmbito do projeto PTDC/AGR-AAM/75506/2006 “Avaliação das propriedades de defesa de quitinases da macieira”, em que se procura analisar a possibilidade de utilização de proteínas de macieira que degradam quitina (quitinases) como fungicidas de origem vegetal. Em trabalho anteriormente realizado, prepararam-se construções genéticas contendo sequências de genes codificadores de quitinases ácidos de classe III, isolados de macieira ‘Royal Gala’. Estas construções foram inseridas em duas estirpes da levedura *Pichia pastoris* (GS115 e KM71H) com vista à expressão heteróloga e produção extracelular das proteínas recombinantes correspondentes. No presente trabalho pretende-se estabelecer uma metodologia que permita a obtenção dos enzimas ativos em larga escala e de seguida avaliar o potencial antifúngico destes, tendo em vista a sua aplicação como agente de biocontrolo. Em particular, procura-se responder às seguintes questões:

- que quantidade de proteína é necessária para obter inibição nos ensaios de eficácia biológica?

- que processamento pós-secreção heteróloga é necessário?
- quais as condições de cultura mais adequadas para a sua produção?
- qual a estirpe mais adequada à expressão heteróloga?
- quais as construções genéticas mais promissoras?

Este trabalho inicia-se por uma revisão bibliográfica sobre a potencial utilização de quitinases como fungicidas e seu enquadramento, apresentando de seguida os materiais utilizados e os métodos desenvolvidos para testar as proteínas produzidas em *P. pastoris* com atividade biológica fungicida. Seguem-se os resultados obtidos e a sua discussão, terminando-se com uma conclusão em que se apresentam as propostas de trabalho futuro que pensamos ser de interesse.

O tema desta dissertação insere-se no âmbito do projeto PTDC/AGR-AAM/75506/2006 “Avaliação das propriedades de defesa de quitinases da macieira” financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A utilização de fungicidas

2.1.1 Enquadramento sobre o aparecimento de fungicidas

O início da aplicação de produtos no combate às doenças remonta ao princípio do século XIX, com a aplicação de enxofre em problemas de oídio. Seguiram-se as descobertas da calda sulfo-cálcica e sulfato de cobre. Mais tarde, em França (1882), Millardet verificou a ação da mistura de cal com sulfato de cobre aplicado em míldio de videira, e divulgou a sua utilização nas regiões vinhateiras com a designação de calda bordalesa (Morton & Staub, 2008; Tomaz, 1958). Na década de 1940 ocorre uma importante descoberta em fitopatologia, quando Flor propôs a teoria do gene-a-gene, na qual refere que tanto a resistência em plantas, bem como a avirulência do patógeno foram herdadas, e que ambas as características eram dominantes. Esta convergência evolutiva entre planta/patógeno, permite compreender que os patógenos podem superar os meios de controlo pela seleção dos hospedeiros/variedades. As mudanças nos genótipos culturais, métodos de produção e técnicas culturais diversas conduzem a uma imagem dinâmica da doença, de modo que os novos métodos para o controle da doença são constantemente necessários (Morton & Staub, 2008).

Desde então foram desenvolvidas diversas moléculas antifúngicas, e atualmente são a classe de pesticidas mais comercializada. Uma consideração importante para o delineamento de estratégias de uso de fungicidas é a ameaça do aparecimento de resistências a substâncias ativas no seio de populações de patógenos. Têm sido desenvolvidos esforços consideráveis por parte da indústria fitofarmacêutica para pesquisar em diversas áreas como por exemplo, o campo dos modos de ação (Morton & Staub, 2008).

2.1.2 Tipos e funções dos fungicidas

Os fungicidas utilizados na proteção de culturas podem ser classificados de acordo com vários critérios com base na sua origem ou grupo químico, seu posicionamento na superfície vegetal, na atuação no patógeno e no seu modo de ação. De acordo com a sua origem os fungicidas podem classificar-se em inorgânicos ou orgânicos de síntese, sendo que os primeiros incluem substâncias com base em arsénio, cobre e enxofre e os seguintes representativos da maioria dos fungicidas homologados no país (Simões, 2005).

Com base no seu posicionamento na superfície vegetal, os fungicidas podem ser agrupados em diferentes tipos: de superfície (ou de contacto), penetrantes, sistémicos e mesostémicos. Os primeiros estabelecem-se superfície da planta sem penetrar, permanecendo depositados no local onde foram aplicados. São necessárias aplicações

com intervalos mais curtos para uma proteção eficaz (Amaro, 2003). Possuem ação preventiva impedindo a germinação dos esporos ou evitam a contaminação das plantas pelo fungo. Os fungicidas penetrantes são aqueles que aplicados na superfície das plantas, atravessam a epiderme sem ser transportados no sistema vascular, podendo ter ação translaminar e alguma difusão lateral (Simões, 2005). Por sua vez o grupo de fungicidas sistêmicos atua penetrando no interior da planta sendo posteriormente translocado através do sistema vascular quer na corrente floémica ou xilémica. Distribuem-se nos tecidos onde permanecem durante períodos variáveis e aí atuam em certos organismos (Amaro, 2003; Simões, 2005). Existe também o grupo de fungicidas do tipo mesostêmico, que atuam na superfície das plantas, sendo absorvidos pela camada cerosa, a que se segue uma movimento de reposição por fase de vapor. Penetram nos tecidos e possuem tipo de ação translaminar (Simões, 2005).

Com base na atuação no organismo patogénio, os fungicidas pode ser: preventivos (protetores ou profiláticos) quando impedem germinação dos esporos e evitam contaminações pelo fungo, curativos (ou terapêuticos) quando atuam após ocorrência de contaminação pelo fungo e erradicantes (ou anti-esporulantes) quando destroem os esporos já formados e impedem a formação de novos esporos (Simões, 2005).

Os fungicidas podem ainda ser classificados de acordo com os seus modos de ação como será abordado no ponto seguinte (ponto §2.1.3).

2.1.3 Vias metabólicas afetadas pelos fungicidas

O modo de ação dos pesticidas consiste na natureza da interferência da sua substância ativa ou de seus metabolitos no alvo ou alvos componentes dos processos fisiológicos ou bioquímicos, causando a morte do organismo a combater. Estes podem ser do tipo multi-alvos (*multi-sites*, *multi-cibles*) quando atuam em diversos, ou do tipo seletivos quando só interferem em um ou poucos alvos (Amaro, 2003).

Segundo Amaro (2003), designam-se por fungicidas tóxicos gerais da célula aqueles que possuem ação multi-alvo, isto é, inibem numerosos mecanismos vitais ao nível da respiração, precipitação de proteínas ou integridade da célula. Incluem os fungicidas mais antigos como o enxofre e os cúpricos e alguns descobertos na década de 40, como os ditiocarbamatos. Os fungicidas com modo de ação seletivo atuam em vias metabólicas ao nível da respiração, da membrana celular e do núcleo. Na respiração, os fungicidas atuam em enzimas importantes no transporte de eletrões no mitocôndrio a nível da ubiquinona, como são o caso da carboxina, e da azoxistrobina, pertencente à família das estrobilurinas. No que diz respeito ao núcleo, a interferência pode dar-se através da inibição da biossíntese de RNA (ácido ribonucleico) pela inibição do enzima polimerase I, ou na

perturbação da metáfase. Ao nível da membrana celular, os fungicidas com este modo de ação afetam a biossíntese de esteróis associados às membranas, como o ergosterol. Existem ainda modos de ação relacionados com o estímulo de defesas naturais da planta (Amaro, 2003).

2.1.4 Novas moléculas antifúngicas

O desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas é um campo de estudo de grande importância, tanto pelo desafio das resistências bem como a procura de alternativas de proteção que minimizem riscos para o homem e meio ambiente.

A testagem de novas moléculas, para fazer face às necessidades fitossanitárias das pomóideas, levou a que surgisse, na década de 80, uma nova família de produtos fitofarmacêuticos – as estrobilurinas. Estas constituem uma classe de compostos fungicidas que podem ser isolados de diferentes espécies de fungos basidiomicetas que degradam a madeira de espécies florestais (Ypema & Gold, 1999). Os isolados originais de estrobilurina A e B, foram conseguidos a partir do fungo saprófita *Strobilurus tenacellus*, um pequeno e comum cogumelo que se desenvolve na madeira degradada de pinheiros bravos, no início da Primavera, na Europa (Anke *et al.*, 1977). As estrobilurinas bloqueiam por completo a respiração mitocondrial, através da inibição específica do centro de oxidação da ubiquinona (Qp) do complexo citocrómico bc_1 , interrompendo o fluxo de electrões do processo de fosforilação oxidativa e, por isso, a síntese de ATP. Essa inibição deve-se à parte activa da molécula, o E- β -metoxiacrilato, responsável pelas propriedades antifúngicas e de inibição da respiração celular (Anke 1995; McKay *et al.*, 2011).

Os fungicidas SDHI inibem o enzima succinato desidrogenase (SDHI); são derivados de uma gama química diversa e dependendo do patógeno e do hospedeiro, possuem atividade protetora, translaminar sistémica. Atuam especificamente na respiração dos fungos, através do bloqueio de zonas de ligação da ubiquinona (também conhecida como Coenzima Q10), no complexo mitocondrial II. A primeira geração de SDHIs, incluindo carboxina e oxicarboxina, tem sido utilizadas a nível mundial, desde o final dos anos 60 e demonstrou elevada eficácia no combate a basidiomicetas, tais como *Rhizoctonia* sp. A segunda geração de SDHIs, nomeadamente boscalide, fluxapiraxade, isopirasame e fluopirame, possui um espectro de ação mais alargado contra uma gama mais ampla de fungos, em diversas culturas. Estes SDHIs de segunda geração destinam-se a uso em programas de proteção integrada e a serem utilizados em mistura ou como alternativa a outros fungicidas, de maneira a prevenir problemas de resistências. Este tipo de fungicidas revela eficácia contra várias doenças em cereais, vinha, prunóideas, morango, actinídea, maçã e cucurbitáceas (McKay *et al.*, 2011).

Outro caso mais recente é o da produção de um biofungicida a partir do tremço, que possui uma ação de degradação da quitina dos fungos. A substância ativa deste fungicida é uma proteína multifuncional denominada 'BLAD', produzida durante a germinação de uma variedade de tremço (*Lupinus albus*). Apresenta inúmeras vantagens como a ausência de toxicidade para o homem e meio ambiente, o que anula os intervalos de segurança antes da colheita dos produtos, podendo destinar-se a áreas de aplicação como a agricultura biológica (BIOCANT, 2013; COMPETE, 2013).

2.2 Quitinases de Macieira

2.2.1 Proteínas PR (*Pathogenesis-Related*)

As plantas estão equipadas com uma variedade de mecanismos de defesa contra o ataque de organismos patogénicos (Sharma *et al.*, 2011). Apesar da ausência de sistema imunitário, que as torna mais vulneráveis a organismos patogénicos (Huynh *et al.*, 1992) as plantas estão envolvidas numa variedade de mecanismos potentes de defesa que incluem a síntese de compostos de baixo peso molecular (Selitrennikoff, 2001). Estas respondem induzindo a expressão de um vasto número de genes codificadores de proteínas que assumem um papel importante na defesa (Collinge *et al.*, 1993) como proteínas e péptidos que possuem atividade antifúngica (Selitrennikoff, 2001).

Uma das respostas de defesa mais estudada diz respeito à expressão de proteínas relacionadas com a patogénese nas quais se inclui o grupo das quitinases (Huynh *et al.*, 1992). Estas foram inicialmente descobertas em 1970, em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) infetadas com o vírus do mosaico do tabaco (TMV), após observação de fenómeno de hipersensibilidade que resultava em lesão necrótica nas folhas (Datta & Muthukrishnan, 1999; Ebrahim *et al.*, 2011; Edreva, 2005). O termo *pathogenesis-related* (PR) foi mais tarde introduzido, em 1980, pelo grupo de trabalho de Antoniw *et al.* (1980) tendo sido este definido como o conjunto completo de proteínas que são codificadas por uma planta hospedeira, induzidas em condições de patogenicidade ou relacionadas com a mesma (Datta & Muthukrishnan, 1999; Huynh *et al.*, 1992). De acordo com a definição, qualquer proteína produzida pelo hospedeiro induzida por qualquer tipo de agente infeccioso, ou condição comparável, é agrupada neste grupo; ainda assim, as características de inclusão implicam critérios de identificação como as propriedades químicas ou a localização celular. Foi também introduzida a terminologia *PR-like proteins* de modo a designar as proteínas homólogas a PRs deduzidas a partir de sequências de aminoácidos ou previstas pela sequência nucleotídica da sua cDNA correspondente ou gene, mas cujo desenvolvimento da indução é feito controladamente, especificamente em determinados tecidos (Edreva, 2005).

A classificação começou por ser feita em cinco grupos principais (PR-1 a PR-5) com base em técnicas moleculares em tabaco, em que cada grupo possuía propriedades similares. Mais tarde, com base nas sequências de aminoácidos, relações serológicas e atividades enzimáticas ou biológicas é estendida a onze famílias (PR-1 a PR-11). O número de famílias de proteínas PR viu-se aumentado até dezasseis (PR-16) com a descoberta de novas proteínas em rabanete, *Arabidopsis* e cevada (Edreva, 2005) e com a introdução de novos critérios.

No que diz respeito às propriedades físico-químicas e tipo de atividade enzimática, as quitinases de plantas foram classificadas como proteínas PR (Collinge *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003). A expressão dos genes que as codificam é induzida por vários fatores de stress como a seca, salinidade, metais pesados ou reguladores de crescimento (Kasprzewska, 2003), como será abordado mais à frente.

As proteínas PR distinguem-se por possuírem propriedades bioquímicas específicas: apresentam baixo peso molecular (6-43 kDa), são extraíveis e estáveis em pH baixo (<3), termoestáveis e muito resistentes a proteases (Datta & Muthukrishnan, 1999). Dependem dos pontos isoelétricos, podendo ser proteínas básicas ou ácidas, apesar de poderem possuir funções semelhantes. A maioria das proteínas PR ácidas está localizada em espaços intercelulares; por sua vez, as proteínas PR básicas estão predominantemente localizadas no vacúolo.

As proteínas PR estão atualmente divididas em 17, sendo que as quitinases englobam três delas (Ebrahim *et al.*, 2011).

O desenvolvimento da pesquisa em mecanismos de defesa das plantas conduziu a um rápido e contínuo interesse nas quitinases, uma vez que foram as primeiras proteínas induzidas por patógenos cuja função foi identificada (Datta & Muthukrishnan, 1999).

2.2.2 Definição e classificação

Quitinases são enzimas de hidrólise ubíquas em muitos organismos (Datta & Muthukrishnan, 1999). Estas catalizam a hidrólise das ligações β -1,4-glicosídicas em quitina, um homopolímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Datta & Muthukrishnan, 1999; Iseli *et al.*, 1996; Kasprzewska, 2003).

Quitinases de plantas são um grupo estruturalmente diverso no que diz respeito às suas propriedades físicas, atividade enzimática e localização, tendo sido divididas em classes com base na sequência de aminoácidos. Algumas, em combinação com β -1,3 glucanases inibem o crescimento de fungos *in vitro*, dando sustentabilidade à hipótese de que estas desempenham um papel importante na defesa contra patógenos (Iseli *et al.*, 1996).

De nome sistemático (1→4)-2-acetamido-2-deoxi - β -D-glucano glicanohidrolase, quitinases são classificados segundo a *Enzyme commission* como enzimas pertencentes à classe dos hidrolases , subclasse dos glicosilases e sub-subclasse dos glicosidases (IUBMB, 2012; Kramer & Muthukrishnan, 1997).

Podem ser agrupadas em duas categorias:

- Os endoquitinases, que hidrolisam aleatoriamente ligações internas β -1,4 – glicosil e muitas destas possuem atividade de lisozima adicional, principalmente aquelas cujo ponto isoelétrico é elevado (Collinge *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003).
- Os exoquitinases, que por sua vez exibem atividade na extremidade não redutora da cadeia de quitina. Hidrolisam ligações β -1,4 apenas nos terminais de GlcNAc (Collinge *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003).

Existem várias nomenclaturas para quitinases: glicosil hidrolases, proteínas relacionadas com a patogénese (*PR-proteins*) como já foi referido, classes de quitinases e famílias de genes (Datta & Muthukrishnan, 1999). Quitinases foram agrupadas em sete classes de acordo com as suas sequências, sendo as características que determinam a classe de quitinase a que pertencem as seguintes: sequência N-terminal, localização da enzima, pH isoelétrico, sinal peptídico e indutores (Patil *et al.*, 2000). Cada classe pertence a uma das duas famílias de glicosidase na qual se verificam dois mecanismos hidrolíticos diferentes (Iseli *et al.*, 1996; Kasprzewska, 2003). As classes I, II, VI e V pertencem à família 19 de glicosidase e abrangem os enzimas cuja origem são plantas (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Iseli *et al.*, 1996) partilhando homologia no seu domínio catalítico juntamente com o seu sinal peptídico. Nesta família foram mais tarde incluídas as classes VI, VII. Por sua vez, a família 18 inclui quitinases provenientes de fungos, animais e bactérias bem como algumas quitinases de plantas da classe III e V (Iseli *et al.*, 1996).

Os quitinases de plantas atuam segundo dois tipos de mecanismos hidrolíticos diferentes. Em quitinases pertencentes à família 19, como é o caso da quitinase de feijão classe I com (32 kDa), ocorre inversão da configuração anomérica do resíduo de GlcNAc hidrolisado. No caso dos enzimas correspondentes à família 18, por exemplo quitinase de abóbora classe III (27 kDa), dá-se a retenção da configuração do resíduo hidrolisado (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Iseli *et al.*, 1996; Kasprzewska, 2003). O quadro 1 enuncia as principais diferenças na classificação de quitinases em famílias de glicosil hidrolases 18 e 19.

Quadro 1: Diferenças entre quitinases das famílias 18 e 19 de glicosidades adaptado de Kasprzewska (2003)

FAMÍLIA DE GLICOSIDASE	CLASSE DE QUITINASE	MECANISMO HIDROLÍTICO	CONFIGURAÇÃO ANOMÉRICA
18	III,V	Substrato assistido	β
19	I,II,IV,VI,VII	Ácido	α

2.2.3 Substratos de quitinase e sua ocorrência e estrutura

O substrato principal de quitinases é a quitina, um homopolímero natural de N-acetilglucosamina, com ligações β -1,4 caracterizado por cadeias longas de conformação helicoidal (Kasprzewska, 2003). A quitina é um polissacárido que possui um largo espectro de distribuição na biosfera (Gohel *et al.*, 2006), sendo o segundo polímero mais abundante a seguir à celulose (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Este polissacárido pode ocorrer em variadas formas cristalinas, mas apenas um tipo, α -quitina foi identificada em insetos (Kramer & Muthukrishnan, 1997). As quitinases são capazes de hidrolisar polímeros diversos como os polissacáridos provenientes de paredes celulares contendo, não só ligações β -1,4 entre moléculas de N-acetilglucosamina, mas também de N-acetilmurâmico. As quebras nas ligações geralmente ocorrem em locais aleatórios ao longo de toda a cadeia do polímero, resultando da ação destes enzimas monómeros de GlcNAc solúveis e de baixo peso molecular, tais como quitotetraoses, quitotrioses, quitobioses, com predominância de oligossacáridos de menor dimensão (Kramer & Muthukrishnan, 1997).

A quitina encontra-se como componente estrutural localizado em alguns órgãos como tegumento de artrópodes, nemátodes e moluscos e exosqueleto de insetos (Gohel *et al.*, 2006; Kramer & Muthukrishnan, 1997). Nos insetos, constitui o componente mais abundante do seu exoesqueleto amplamente composto por complexos proteína/quitina (Gohel *et al.*, 2006). Também é muito abundante na parede celular de muitos fungos, tais como Ascomycetes, Basidiomycetes e fungos mitospóricos (ex-Deuteromycetes) (Collinge *et al.*, 1993). A quitina compreende 22 a 44% da parede celular de fungos (Gohel *et al.*, 2006; Patil *et al.*, 2000). A sua presença como outros polissacáridos é usada como critério na taxonomia dos fungos (Gohel *et al.*, 2006). Sendo um componente comum presente na parede celular de fungos e no exosqueleto de artrópodes, e atendendo a que muitos destes organismos constituem importantes patógenos e pragas (Collinge *et al.*, 1993), formulações com base em quitinases que hidrolisam a quitina são uma potencial oferta como agentes de biocontrolo (Gohel *et al.*, 2006).

As quitinases das plantas têm também como substratos alternativos o peptidoglicano presente na estrutura das bactérias (Collinge *et al.*, 1993; Iseli *et al.*, 1996), o que lhes permite também hidrolisar a parede celular das mesmas (Iseli *et al.*, 1996). Os enzimas que possuem atividade de lisozima adicional possuem a capacidade de quebrar o peptidoglicano, um polímero de N-acetilglucosamina e resíduos de ácido N-acetilmurâmico, com ligações β -1,4 (Kasprzewska, 2003), sendo os substratos de quitinases e lisozimas muito semelhantes.

Quitinases classe III

Quitinases de classe III possuem uma estrutura única e sem relação com qualquer uma das outras classes de quitinases. Pertencem à família PR-8 e à família 18 de glicosil-hidrolases. Esta classe tem geralmente atividade de lisozima, tendo sido a sua descrição inicial, pelo que possui uma relação próxima com quitinases bacterianas (Ebrahim *et al.*, 2011) e os seus elementos têm origem maioritariamente em plantas e fungos. Juntamente com a classe V formam a família 18 de glicosil hidrolases (Cohen-Kupiec & Chet, 1998).

Os enzimas da classe III têm elevada homologia na sequência de aminoácidos com a quitinase lisozima bifuncional de *Hevea brasiliensis* (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). De facto após ter sido determinada a estrutura desta quitinase bifuncional, verificou-se a semelhança na mesma quando comparada com uma família de quitinases bacterianas publicadas em simultâneo (Datta & Muthukrishnan, 1999). Os enzimas pertencentes à classe apresentam uma vasta gama de pontos isoelétricos, atividade sobre uma vasta gama de pH e temperatura de estabilidade até 60-70°C (Ebrahim *et al.*, 2011).

Quitinases de classe III de plantas têm em comum com quitinases de bactérias o mesmo mecanismo e similaridade na estrutura tridimensional (Iseli *et al.*, 1996). Pertencem à família 18 de glicosil hidrolases, que incluem os enzimas bifuncionais que também possuem atividade de lisozima, em particular algumas do tipo básicas, podendo deste modo contribuir para a proteção contra infeções bacterianas. Podem ocorrer expressão de quitinases de classe III tanto ácidas como básicas simultaneamente na mesma planta, o que implica funções diferentes (Park *et al.*, 2002). Na figura 1 é apresentada a estrutura do enzima quitinase ácido classe III de macieira.

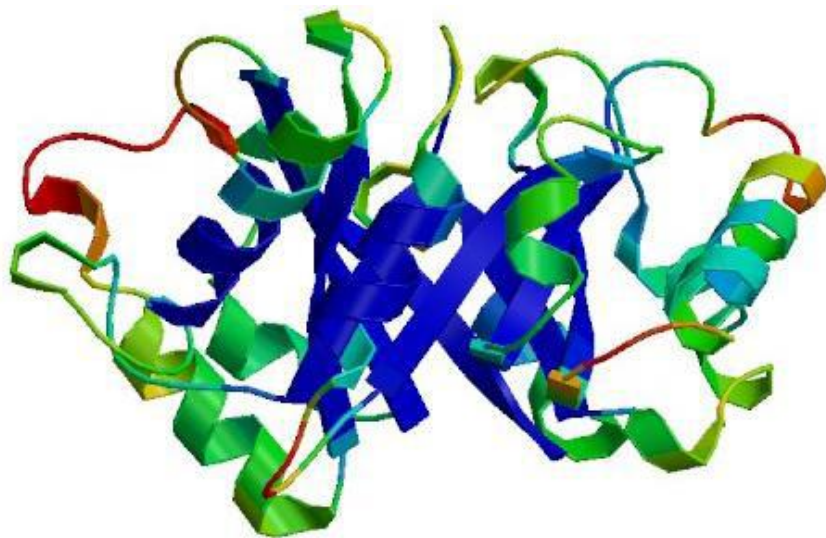


Figura 1: Modelação por homologia do enzima quitinase ácido da classe III de macieira, codificado pelo gene *Chi1*. Estrutura em *ribbon*. Programa SPDB Viewer
(Fonte: Sousa, 2011).

2.2.4 Regulação e expressão das quitinases

2.2.4.1 Fatores de expressão

Inicialmente pensava-se que a expressão de genes que codificam proteínas PR, como é o caso das quitinases, se devia à presença de patógenos, isto é, que teriam apenas origem biótica (Kasprzewska, 2003). Atualmente sabe-se que estas enzimas podem ser expressas constitutivamente a níveis baixos ou ser estimulada a sua expressão através de agentes abióticos (etileno, ácido salicílico, soluções salinas, ozono e luz UV) e bióticos (fungos, bactérias, vírus, viróides, componentes da parede celular de fungos e oligossacáridos) (Punja & Zang, 1993; Sharma *et al.*, 2011).

Em plantas são sabe-se que algumas formas de quitinases são sintetizadas constitutivamente no vacúolo e no apoplasto e que um dos fatores que faz variar essa expressão é a idade da planta. Este tipo de expressão aumenta com a idade da planta e verifica-se na maior atividade quitinolítica detetada em folhas velhas quando comparada com tecidos jovens. Em *Cucumis sativus*, a expressão de genes que codificam a quitinase de classe III aumenta durante o crescimento da planta, sendo que a expressão diminui da base (parte mais velha) para o topo (tecidos jovens) (Kasprzewska, 2003; Lawton *et al.*, 1994).

- **Fatores Bióticos**

As quitinases podem facilmente ser induzidas a partir de um estímulo de origem biótica como é o caso de patógenos, insetos, nemátodes e herbívoros (Datta & Muthukrishnan, 1999; Edreva, 2005; Kasprzewska, 2003) ou até por plantas *Orobanch*e comprovadamente capazes de desempenhar o papel de indutor biótico identificado em raízes de plantas de tabaco (Edreva, 2005; Joel & Portnoy, 1998).

De facto, quando induzida a expressão por patógenos, estes podem-se revelar potentes indutores na formação de proteínas PR, uma vez que produzem eliciadores diversos. Exemplo disso são os polissacáridos de parede celular de fungos sobejamente conhecidos, como o glucano e a quitina. Determinados fungos também segregam glicoproteínas, péptidos e, proteínas da família da elicítina. Os enzimas de divisão da parede celular como as poligalacturonases além de conduzir à acumulação de proteínas PR, também libertam moléculas biologicamente ativas das paredes celulares das plantas designados por eliciadores endógenos, capazes de induzir respostas de defesa em plantas (Edreva, 2005). O ataque por patógenos conduz ao aumento de ácido salicílico e ácido jasmónico endógeno das plantas, que por sua vez são compostos indutores de relevância que mencionarei de seguida (Kasprzewska, 2003).

- **Fatores Abióticos**

Uma classe especial de indutores é o caso das fitohormonas. A presença de ácido salicílico conduz à expressão de proteínas PR ácidas, por sua vez no caso do etileno e ácido jasmónico leva à expressão de proteínas PR do tipo básicas (Ding *et al.*, 2002; Kasprzewska, 2003). O mesmo se sucede em *Arabidopsis thaliana* quando sujeitas a tratamento com etileno, o nível de expressão de genes de quitinases básicas aumenta com a idade da planta (Kasprzewska, 2003).

A par dos fatores mencionados anteriormente, a transcrição de genes de quitinases pode aumentar com a presença de outro tipo de estímulos adversos externos, como são o caso da seca, do frio, da presença de metais pesados ou de feridas, do excesso de salinidade e da luz ultravioleta (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Ebrahim *et al.*, 2011; Edreva, 2005; Kasprzewska, 2003).

2.2.4.2 Localização celular e tecidual

As proteínas PR no seu geral podem apresentar dois tipos de localização celular: vacuolar ou apoplástica, sendo este último o local preferencial de maior acumulação (Datta & Muthukrishnan, 1999; Edreva, 2005). Tem-se verificado que as quitinases de um vasto número de espécies de plantas apresentam também isoformas básicas e ácidas (Ebrahim

et al., 2011) que possuem padrões distintos de localização subcelular; as ácidas apresentam destino extracelular, como é o caso dos enzimas quitinases de macieira em estudo e das quitinases classes III em geral, e as básicas que preferencialmente acumulam-se no vacúolo central (Ebrahim *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 1992). Estudos em plantas de tabaco indicaram que proteínas do tipo PR-1 ácidas tinham localização no apoplasto, enquanto proteínas do mesmo tipo, básicas teriam acumulação vacuolar. Porém foram identificadas diversas proteínas PR de formas ácidas e básicas em ambos os compartimentos (Edreva, 2005).

No que diz respeito à localização tecidular, as proteínas PR como quitinases encontram-se em todos os órgãos das plantas: folhas, raízes, flores ou caules, mas são particularmente abundantes em folhas onde se acumulam e representam cerca de 5-10% do total das proteínas totais da folha (Edreva, 2005). Em *Cucumis sativus* e *Arabidopsis thaliana* verificou-se a expressão constitutiva de quitinases de classe III em feixes vasculares e células guarda, e de classe I em estruturas como raízes ou tecidos florais (Kasprzewska, 2003; Lawton *et al.*, 1994).

2.2.5 Funções de quitinases

Quitinases estão presentes em vários organismos sendo o seu papel variável de acordo com o organismo de origem e podem desempenhar diferentes funções (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Kasprzewska, 2003). Em bactérias, as quitinases estão provavelmente envolvidas no processamento e digestão de macromoléculas contendo GlcNAc como fonte nutritiva (Kramer & Muthukrishnan, 1997), uma vez que procedem à degradação da quitina e de seguida distribuem o carbono e azoto às células (Kasprzewska, 2003). Podem ainda auxiliar no processo de parasitismo (Patil *et al.*, 2000).

Em artropodes, estes enzimas estão envolvidos na mudança da cutícula e sua mobilização, bem como na digestão de nutrientes. Estes enzimas foram encontrados em fluidos de muda, glândulas venenosas e intestino médio de diversos insetos. Os insetos libertam periodicamente o seu exoesqueleto antigo ou então mudam as suas membranas peritróficas e resintetizam novas, continuamente ou periodicamente. Este processo é mediado pela síntese de quitinases em fluidos de muda acumulados no espaço entre a cutícula antiga e a epiderme, e em tecidos do intestino. Frequentemente a larva ingere e digere a cutícula antiga ou a exúvia, cujos componentes acabam por ser reciclados. Este comportamento coincide com o período de expressão de quitinases no intestino (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Aparentemente, as quitinases que surgem no intestino possuem uma função digestiva a somar ao seu papel de destruturação da quitina envolvente no revestimento do intestino ou membrana peritrófica. Nos venenos de alguns Hymenoptera,

quitinases podem acelerar o alastramento dos compostos venenosos a partir do local de formação (Kramer & Muthukrishnan, 1997).

Nos fungos, as quitinases aparentemente desempenham um papel de ajuda na degradação e mobilização da matéria orgânica, tal como sucede com quitinases bacterianas, e possivelmente contribuem para antagonizar o crescimento de competidores. Também apresentam atividade micoparasítica contra diversos fungos fitopatogénicos, como ocorre em espécies *Trichoderma*, tornando-o um agente de biocontrolo (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). A presença de agentes microbianos com capacidade de degradar quitina é também importante na reciclagem do azoto no solo (Ebrahim *et al.*, 2011). Por sua vez em fungos, protozoários e invertebrados estão também envolvidas na morfogénese (Kasprzewska, 2003; Patil *et al.*, 2000). Em leveduras, as quitinases são importantes na sua reprodução (Kramer & Muthukrishnan, 1997) como se verifica em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Gohel *et al.*, 2006). Algumas investigações sugerem que tanto em animais como em plantas, quitinases podem estar relacionadas não só com processos de defesa ou em resposta a stress mas também nos processos de crescimento e desenvolvimento (Kasprzewska, 2003; Patil *et al.*, 2000). Por exemplo, em trabalhos realizados em plantas *Beta vulgaris*, onde ocorre a expressão de genes de quitinases classe IV após infeção por patógeno compatível, estas enzimas não demonstraram influência no progresso da doença nem se verificou atividade antifúngica em ensaios *in vitro* (Kasprzewska, 2003). Quitinases homólogas a PR-3 e PR-4 atuam como fatores morfogénicos na embriogénese em cenoura (Edreva, 2005). Em animais e plantas, as quitinases desempenham maioritariamente um papel de defesa do organismo contra o ataque de organismos patogénicos (Kasprzewska, 2003). Em humanos, pensa-se que quitinases desempenhem um papel de defesa contra organismos patogénicos (Duo-Chuan, 2006)

As quitinases possuem uma dupla função durante a colonização dos fungos (Collinge *et al.*, 1993). Além da capacidade de ataque direto à parede celular dos fungos, estas permitem a libertação de oligo-N-acetil glucosaminas que funcionam como eliciadores na ativação de respostas relacionadas com a defesa em células de plantas (Gohel *et al.*, 2006) Esta temática será abordada com detalhe no ponto seguinte (§2.2.6). No quadro 2, seguidamente apresentado, são referidas as principais funções de quitinases identificadas em diversos organismos.

Quadro 2: Funções das quitinases

ORGANISMO	FUNÇÕES DE QUITINASES	REFERÊNCIAS
Bactérias	Nutrição e parasitismo Mineralização da quitina no solo	Cohen-Kupiec e Chet (1998) Patil <i>et al.</i> (2000); Kasprzewska (2003)
Fungos	Morfogénese Mineralização da quitina no solo Micoparasitismo (<i>Trichoderma</i> spp.)	Kasprzewska (2003) Ebrahim <i>et al.</i> (2011) Cohen-Kupiec e Chet (1998)
Plantas	Antifúngica e antibacteriana – defesa pela degradação da parede celular Crescimento Morfogénese em cenoura	Kasprzewska (2003) Edreva (2005)
Insetos	Processos de desenvolvimento na degradação da cutícula em diferentes estados larvares Desenvolvimento pós-embrionário	Kramer e Muthukrishnan (1997) Duo-Chuan (2006)
Leveduras	Separação celular durante a replicação (<i>S. cerevisiae</i>)	Gohel <i>et al.</i> (2006)
Humanos	Proteção (sistema digestivo)	Selitrennikoff (2001)
Animais	Presente no suco digestivo	Gohel <i>et al.</i> (2006)
Protozoários	Morfogénese	Gohel <i>et al.</i> (2006) Kasprzewska (2003)

As plantas superiores sintetizam sete classes de quitinases diferentes, que diferem na estrutura da proteína e em especificidade ao substrato (Brunner *et al.*, 1998). Verificou-se que o seu papel não atua exclusivamente na defesa contra ataques de patógenos, especialmente porque muitos destes enzimas obtiveram resultados negativos no que diz respeito a propriedades antifúngicas em ensaios *in vitro* (Kasprzewska, 2003). Apesar de muitos dos estudos se focarem no papel deste enzimas como proteínas PR, as quitinases como outras proteínas PR de plantas encontram-se relacionadas com o fenómeno de associações de micorrizas (Kasprzewska, 2003). Atuam ainda no crescimento de plantas e resistência ao frio. Algumas acumulam-se durante a transição das plantas na floração e senescência, o que sugere o seu papel no desenvolvimento (Edreva, 2005).

2.2.6 Atividade quitinolítica e seu interesse agronômico

Um vasto número de proteínas com atividade quitinolítica foi identificado em plantas. A atividade está presente em diversos organismos mesmo naqueles em que se verifica ausência de quitina tais como vírus, caracóis, peixes, anfíbios, mamíferos e também gimnospérmicas e angiospérmicas (Kasprzewska, 2003).

As quitinases provenientes dos vacúolos mostraram maior atividade contra a quitina cristalina, enquanto as formas apoplásticas mostraram-se mais ativas sobre quitina solúvel (Collinge *et al.*, 1993; Sharma *et al.*, 2011). Em estudos realizados em quitinases de *Toxoneuron nigriceps* (Hymenoptera: Braconidae) expressas em plantas de tabaco, verificou-se que apesar de baixa atividade quitinolítica, ocorre atividade inseticida (Rossi *et al.*, 2012).

Uma importante característica da maioria das proteínas PR é o seu efeito antifúngico. Algumas exibem também atividade antibacteriana, inseticida e nematodocida tendo sido igualmente descobertas algumas com propriedades antivirais. A toxicidade de proteínas PR pode ser representada na sua generalidade pela capacidade hidrolítica, inibidora de proteínas e habilidade de permeabilizar membranas estruturais. Enzimas hidrolíticas (β -1,3-glucanases, quitinases e proteinases) podem ser uma ferramenta útil no enfraquecimento e decomposição da parede celular em fungos contendo glucano, quitina e proteínas (Edreva, 2005). Como já foi mencionado, este tipo de proteínas pode atuar em percurso alternativo, envolvendo a libertação hidrolítica de fragmentos de quitina e glucano provenientes da parede celular dos fungos. Estes oligossacáridos desempenham um papel essencial como eliciadores, o que permite induzir reações de defesa em cadeia (Edreva, 2005).

Várias investigações sugerem a participação de quitinases em mecanismos de defesa contra organismos contendo quitina na sua constituição (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Verificou-se que quitinases purificadas a partir de cevada inibiam o crescimento micelial de fungos. Recentemente, em trabalho realizado a partir de quitinases isoladas de *Aspergillus niger* LOCK 62 verificou-se inibição do crescimento de fungos fitopatogénicos como: *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*. Nesse mesmo estudo, o crescimento dos fungos *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, e *Fusarium oxysporum* não foram afetados (Brzezinska & Jankiewicz, 2012).

A expressão heteróloga de genes de quitinases de plantas foi uma ferramenta usada em vários desses estudos com plantas com o objetivo de fomentar os seus mecanismos de defesa em relação a fungos patogénicos (Cohen-Kupiec & Chet, 1998).

A parede celular dos fungos protege o organismo contra o ambiente hostil e transmite sinais de invasão e infecção na presença de um possível hospedeiro seja planta, animal ou humano. Determina também a forma das células e desempenha um papel importante durante o crescimento dos mesmos. A quitina, um homopolímero de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) juntamente com β -(1,3)-glucano, representam os componentes estruturais mais importantes da parede celular do fungo, contribuindo para a sua rigidez (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011). É importante referir que os fungos possuem uma pressão interna de turgescência significativa portanto qualquer perturbação na sua parede celular resulta na lise das suas células (Selitrennikoff, 2001). Na figura 2 é apresentado um esquema da parede celular e os seus constituintes.

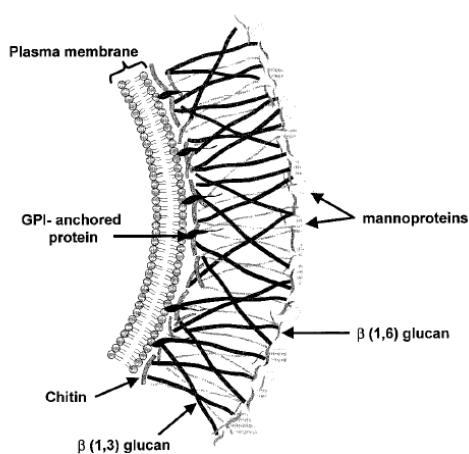


Figura 2: Esquema da parede celular de um fungo.
GPI – glycoposphatidylinositol
Fonte: Selitrennikoff (2001).

Uma vez que a maioria das quitinases é induzida por fatores de stress, principalmente por infecção, e tendo sido verificadas propriedades antifúngicas de algumas isoformas em ensaios *in vitro*, o papel das quitinases está intimamente associado a mecanismos de defesa induzida ou constitutiva contra patógenos (Kasprzewska, 2003).

No que diz respeito ao envolvimento da quitinase na patogénese, mais concretamente na colonização por fungos patogénicos, estas apresentam dupla função. As quitinases provenientes do apoplasto protegem em estados iniciais da infecção, acompanhadas da libertação de moléculas eliciadoras que transmitem a informação da infecção pela hifa que penetrou o espaço intercelular (Collinge *et al.*, 1993; Kasprzewska, 2003). Estas características estão organizadas no quadro 3.

Quadro 3: Funções de quitinases apoplásticas e vacuolares na patogênese

ISOFORMAS	QUITINASES	FUNÇÃO NA PATOGÊNESE	REFERÊNCIAS
Ácidas	Apoplásticas	Desempenham funções em estados iniciais e libertam eliciadores	Kasprzewska (2003) Collinge <i>et al.</i> (1993)
Básicas	Vacuolares	Degradam as cadeias de quitina inibindo o crescimento do fungo	Edreva (2005)

Em plantas transgênicas:

Tal como β -1,3-glucanases, as quitinases inibem apenas um limitado número de espécies de fungos, contudo estes dois enzimas têm um efeito sinérgico. As quitinases de plantas atuando isoladamente, por vezes apenas afetam a extremidade da hifa, sendo ineficazes na degradação efetiva das estruturas duras da quitina dos fungos. Contudo, quando estes enzimas se encontram combinados verifica-se um efeito de sinergia conduzindo ao aumento da sua eficácia. Existem fortes indicações de que quitinases juntamente com β -1,3-glucanases participam em conjunto num sistema de defesa de plantas contra fungos patogênicos (Ebrahim *et al.*, 2011).

2.3 Produção de quitinases e sua utilização

2.3.1 Produção direta em plantas e fungos

Existem diversos estudos de purificação e caracterização de quitinases a partir de fungos, ainda assim encontram-se limitados a alguns fungos específicos. Em fungos micoparasíticos, a purificação foca-se essencialmente no sistema quitinolítico de *Trichoderma harzianum*, tendo sido também realizados trabalhos de purificação a outros fungos micoparasíticos como *Aphanocladium album* e *Fusarium chlamydosporum* (Duo-Chuan, 2006). Os enzimas quitinolíticos secretados por *Trichoderma* spp. têm recebido muita atenção devido ao seu poder inibidor contra diversos fungos fitopatogênicos (Haggag, 2002), razão pela qual têm vindo a ser comercializados vários fungicidas nos últimos anos com base nesta espécie (El-Katatny *et al.*, 2000). Em ensaios efetuados, este fungo antagonista que secreta diretamente enzimas de degradação, incluindo quitinases, manifestou capacidade de degradação da parede celular do fungo *B. cinerea*, reduzindo a incidência da doença (Haggag, 2002).

Em diversos estudos de clonagem molecular que envolvem quitinases e bactérias *Bacillus thuringiensis*, cuja aplicação resulta também como biopesticida, verificou-se o aumento da eficácia deste agente de biocontrole quando combinado com quitinases, quer transformada na bactéria, como em plantas geneticamente modificadas com a resistência (Patil *et al.*, 2000).

2.3.2 Produção indireta

No que diz respeito à produção indireta de quitinases, são vários os trabalhos elaborados que referem a utilização destas quitinases de interesse em processos de transformação e clonagem, podendo ser efetuada tanto em bactérias, leveduras como em plantas transgênicas. Em plantas de tabaco modificadas geneticamente expressando a quitinase Cts1 de *S.cerevisiae* verificou-se a inibição tanto a nível de crescimento micelial como de germinação dos esporos de *B. cinerea* (Duo-Chuan, 2006).

2.3.2.1 Expressão heteróloga

A produção *in vivo* de uma proteína trata-se de um processo muito complexo e regulado que envolve modificações pós-traducionais, importantes para a sua estabilidade e atividade biológica. É também um processo que envolve muitos enzimas e co-factores atuando em várias etapas (Desai *et al.*, 2010). A expressão heteróloga consiste na produção de uma proteína fora do seu hospedeiro de origem, sendo esta designada como proteína heteróloga.

Para obter proteínas heterólogas são necessárias as seguintes ferramentas: gene ou cDNA que codifique a proteína de interesse, um vetor e um sistema biológico (sistema de expressão) adequados capazes de transcrever e traduzir o transgene na proteína de interesse. Segundo Desai *et al.* (2010), um sistema de expressão viável deve ser capaz de produzir a proteína requerida na conformação correta, ter boa produtividade, ser fácil de manter e manipular e ainda ser seguro e economicamente viável.

Os sistemas de expressão podem ter algumas limitações em termos de adequabilidade, custo, purificação e modificações pós-traducionais (Desai *et al.*, 2010), razão pela qual não existe um único sistema de expressão capaz de responder a estes critérios. A escolha deverá ser feita com base no sistema que melhor se adapta ao estudo. A bactéria *Escherichia coli* foi o sistema pioneiro, tendo já sido também utilizado como sistema de expressão células de mamíferos, leveduras, insetos, plantas transgênicas e animais transgênicos (Desai *et al.*, 2010).

Segundo Sousa (2011) a expressão heteróloga em leveduras revela-se a mais indicada para expressar proteínas puras de organismos superiores, em grandes quantidades. Permite conjugar as vantagens dos sistemas procarióticos (fácil manipulação, crescimento

rápido, genética bem caracterizada) com as vantagens dos sistemas eucarióticos (capacidade de realizar processamento e modificações pós-tradução), criando um bom compromisso entre as bactérias e as células de eucariotas superiores.

As ferramentas da biologia molecular permitiram ultrapassar a barreira entre espécies e deste modo produzir proteínas do nosso interesse em espécies da nossa escolha. Esta simples capacidade tem permitido a obtenção de um vasto número de proteínas/enzimas com diversas aplicações (Desai *et al.*, 2010).

2.3.2.2 Levedura *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* (figura 3) é um organismo modelo utilizado em diversos estudos, nomeadamente em expressão heteróloga e amplamente estudado no que diz respeito a métodos e meios de cultura no sentido de otimizar a cultura contínua em larga escala. Possui algumas particularidades que a tornam apta como sistema de expressão, como a facilidade de manuseamento, muito semelhante à de *Saccharomyces cerevisiae* (Cereghino, 2000). Uma das suas características principais consiste na capacidade de utilizar metanol como única fonte de carbono e energia. Trata-se de uma levedura metilotrófica, que recorre preferencialmente ao crescimento em metanol em vez de processos fermentativos, como ocorre em *S.cerevisiae*. As estirpes de *P. pastoris* utilizadas em expressão heteróloga derivam todas de estirpe selvagem (WT – wild type), com mutações ao nível dos genes que codificam enzimas importantes para o seu metabolismo em metanol (Higgins & Cregg, 1998). Dessas mutações resultam estirpes com diferentes capacidades de expressão em metanol, sendo nuns casos esta mais lenta e noutros mais rápida. Existe por isso uma classificação das estirpes através do fenótipo Mut, em que estirpes Mut⁺ crescem à velocidade da estirpe WT em meio metanólico, as Mut⁻ não crescem em metanol, e as Mut^s crescem em metanol a uma velocidade lenta (Higgins & Cregg, 1998).

Produz baixa secreção de proteínas do tipo endógeno, permitindo que as proteínas de interesse expressadas sejam secretadas para o meio e constituam a fração mais significativa do mesmo sendo por isso mais fáceis de purificar. Na expressão das proteínas clonadas, é necessário ter em conta a necessidade da presença de um sinal peptídico no terminal amino da proteína, para que esta seja inserida na via secretora. Um dos sinais peptídicos habitualmente mais usado é a sequência que codifica para o α -factor da levedura *S. cerevisiae*. A utilização de um sinal nativo para resolver problemas de *folding* e estabilidade da proteína também costuma ser adotada (Cereghino, 2000; Sousa, 2011).

Também por ser capaz de efetuar modificações pós-traducionais associadas a Eucariotas superiores, permite que as mesmas sejam expressas com a conformação adequada e em função disso, mantendo a atividade.

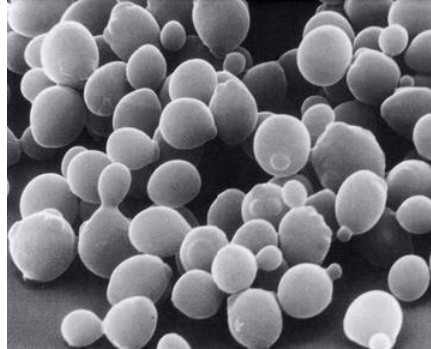


Figura 3: Levedura *Pichia pastoris*
(Fonte: br.dir.groups.yahoo.com)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Fungos em estudo

Origem e condições dos fungos em estudo:

- Os isolados de *Ilyonectria macrodydima* (Cy 244), os isolados de *B. cinerea* e os isolados de *Stemphylium* sp. encontravam-se conservados na coleção de fungos do ISA, em tubos contendo gelose de batata dextrosada (Potato Dextrose Agar - PDA, Difco, Detroit, E.U.A.), à temperatura aproximadamente de 5°C, na obscuridade.
- Os isolados de *Venturia inaequalis* usados no estudo, foram fornecidos pela Dr.^a Mariana Mota (Origem: Bombarral) encontrando-se conservados em meio enriquecido com malte (Malt Agar - MA, Difco, Detroit, E.U.A.) (anexo 1).

As culturas usadas nos ensaios de eficácia biológica foram repicadas para placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, contendo 15 mL de PDA e incubadas para a temperatura de 20°C±1°C para os isolados de *B. cinerea* e a 25°C±1°C para os restantes isolados, em condições de obscuridade. A seleção dos agentes patogénicos para este estudo foi feita de acordo com parâmetros como a rapidez de crescimento da cultura e existência de alguns estudos deste tipo (Brzezinska & Jankiewicz, 2012; Huynh *et al.*, 1992) razão pela qual se efetuou o maior número de ensaios em *B. cinerea*. Os restantes, *Stemphylium* sp., *I. macrodydima* e *V. inaequalis* foram escolhidos pela sua importância no contexto de fitossanidade das culturas.

3.1.1.1 *Botrytis cinerea* Pers. Ex Nocca & Balb., 1821

Trata-se de um fungo amplamente distribuído no mundo, particularmente em regiões temperadas. A ocorrência deste patógeno é transversal a várias culturas que vão desde fruteiras a hortícolas, sendo também causador de problemas em culturas ornamentais. Possui cerca de duzentos hospedeiros diferentes e o seu controlo a nível da cultura ainda é difícil de alcançar. Causa a designada podridão mole ou podridão cinzenta em culturas como o morango e em vinha. *B. cinerea* é um fungo Ascomyceta sendo o seu estado teleomórfico designado por *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. Pelo facto de este ser pouco frequente na natureza, apenas será feita uma breve descrição das características do seu anamorfo. Produz micélio abundante de cor acinzentada, e é composto por hifas e conidióforos ramificados em cuja extremidade se formam conídios hialinos unicelulares e de forma ovoide, como mostra a Figura 4a.

Os conídios quando maduros são libertados quando as condições meteorológicas são favoráveis, podendo ocorrer a sua disseminação através de salpicos de chuva ou correntes de ar. O fungo produz esclerotos como estruturas de resistência, de aspeto irregular e coloração negra, que permanecem nos tecidos infetados ou mortos. Os esclerotos são produzidos maioritariamente em obscuridade, e este fungo cresce favoravelmente em PDA (Crous *et al.*, 2009) como se pode observar pela Figura 4b.

O patógeno consegue sobreviver no solo associado à matéria orgânica ou na forma de esclerotos. Após a germinação dos mesmos (em plantas doentes ou restos de plantas infetadas), o fungo produz micélio e novamente conídios que são dispersos para novos hospedeiros. A germinação dos conídios é favorecida por temperaturas de 22-25 °C e humidade relativa de 90-100 %. O patógeno é necrotrófico, obtendo os seus nutrientes através de tecidos mortos ou doentes.

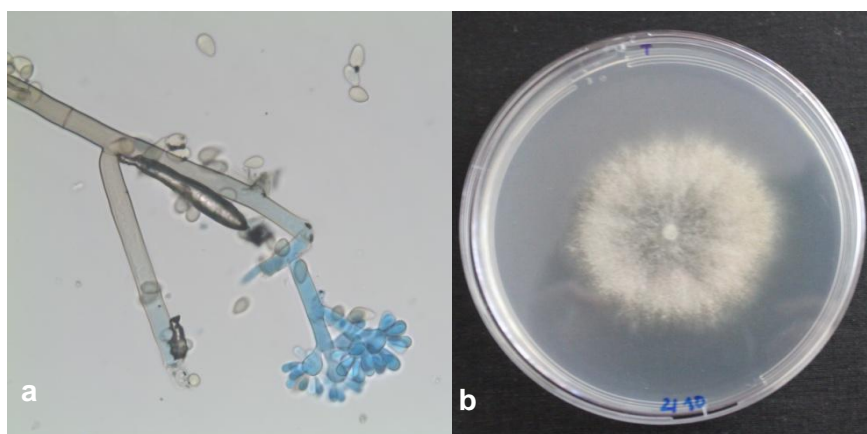


Figura 4: *Botrytis cinerea* a) ampliação 400x; b) Crescimento do micélio do fungo em PDA - dois dias à temperatura de 20°C (original da autora).

3.1.1.2 *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.

O pedrado trata-se de uma doença chave na cultura da maçã e é responsável pelas mais importantes quebras na produção em pomares de macieira. Ataca todos os órgãos em crescimento da planta, desde o abrolhamento dos gomos até ao período de pós-colheita. O seu agente causal designa-se no estado sexuado por *V. inaequalis* (Cke.) Wint. e pertence à divisão Ascomycota, cuja parede celular contém quitina na sua constituição (Mota, 2002), classe *Dothideomycetes*, ordem *Pleosporales*, e família *Venturiaceae*.

Caracteriza-se por formar pseudotecas nas folhas que permanecem no solo durante o inverno, contendo cada uma delas cerca de 50-100 ascos. Os ascos são oblongos (40-70 µm x 8-12 µm) bitunicados, e contêm no seu interior ascósporos amarelo-esverdeados lisos, oblongos e com duas células não idênticas (que conferem o nome à espécie). O anamorfo *Spilocaea pomi* Fr. desenvolve conídios a partir de conidióforos simples e eretos.

Este fungo apresenta duas fases distintas no seu ciclo de vida, saprofítica em folhas ou frutos mortos destacados da árvore, e uma fase parasítica em órgãos vivos nas árvores. Hiberna sob a forma de pseudotecas nas estruturas caídas no solo do pomar. O combate a esta doença é feito essencialmente pela aplicação de fungicidas (Rego & Mota, 2013).

3.1.1.3 *Ilyonectria macrodidyma*

Os fungos pertencentes ao género *Ilyonectria* constituem os principais agentes causais da doença do pé negro em videira que afeta as principais zonas de produção em todo o mundo. Estes patógenos causam necroses na zona basal de porta enxertos conduzindo ao declínio e morte de jovens videiras tanto em viveiros como em vinhas (Reis *et al.*, 2013) e afetando maioritariamente videiras entre os dois e os oito anos de idade (Cardoso, 2011). Com base em diversos estudos, existem pelo menos quatro complexos causais responsáveis pela doença do pé negro em videira, designados por *I. liriodendri* e *I. macrodydima* (Cabral *et al.*, 2011; Cardoso, 2011; Halleen *et al.*, 2004), e duas espécies *Campylocarpon*, *Campylocarpon fasciculare* e *Campylocarpon pseudofasciculare* (Cabral *et al.*, 2011; Halleen *et al.*, 2004). Do grupo de agentes causais referidos, *I. liriodendri* e *I. macrodydima* constituem as espécies mais frequentemente isoladas. Em estudos efetuados em ambos os géneros verificou-se que os sintomas causados em videiras eram semelhantes, não havendo diferenças significativas a nível de virulência (Cabral *et al.*, 2011; Cardoso, 2011; Halleen *et al.*, 2004). Na figura seguinte (figura 5) são apresentadas imagens do isolado em estudo.

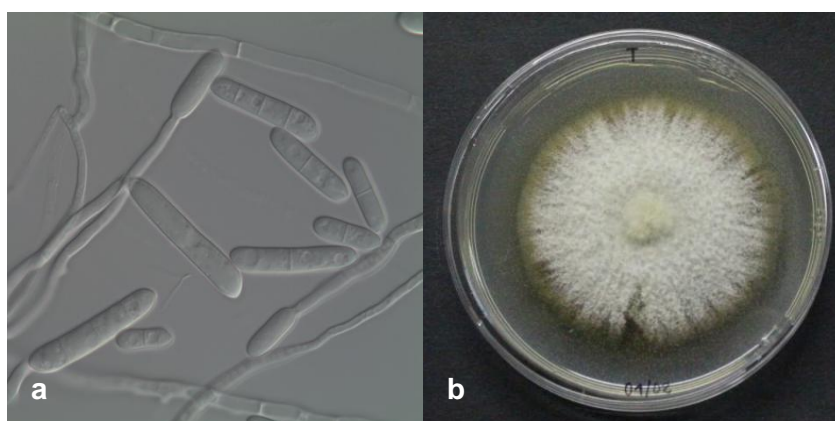


Figura 5: *Ilyonectria macrodydima*, isolado Cy244: a) ampliação 1000x (Fonte:Reis (2010); b) crescimento micelial em PDA – cinco dias à temperatura ambiente (original da autora).

3.1.1.4 *Stemphylium* sp.

No género *Stemphylium*, as espécies *S. vesicarium* (Wallroth) Simmons e *S. botryosum* encontram-se referenciadas como causadoras de doenças em hortícolas um pouco por todo o mundo (Bizarro, 2012). A estenfiliose da pereira causada por *S. vesicarium* é uma doença com grande importância económica em áreas de produção de pêra na zona mediterrânea. Trata-se de uma doença comum em pereira e em certas regiões a sua importância económica é comparada ao pedrado. As suas infeções e necroses ocorrem em folhas, frutos e numa menor extensão em galhos, em resultado da penetração do fungo (Montesinos & Vilardell, 1992). Os fungos do género *Stemphylium* hibernam sob a forma de pseudotecas nas folhas caídas no solo. Após maturação destas estruturas, ocorre a libertação de ascósporos que por sua vez vão infetar e colonizar os tecidos das folhas, dando origem às contaminações primárias. De seguida dá-se a formação dos conídios, responsáveis pelas contaminações secundárias (Llorente & Montesinos, 2002). Na figura 6 apresenta-se imagem referente ao crescimento em PDA de um isolado de *Stemphylium* sp.

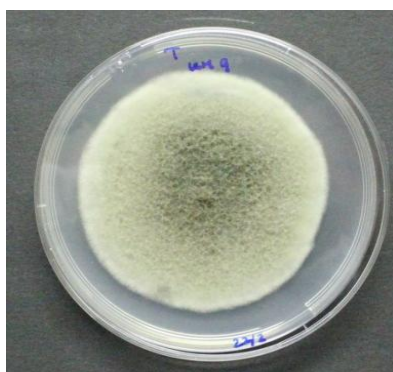


Figura 6: *Stemphylium* sp., crescimento de uma colónia em PDA – cinco dias à temperatura ambiente (original da autora).

No quadro 4 encontram-se algumas características importantes dos fungos em estudo.

Quadro 4: Características importantes dos fungos em estudo

FUNGO	FILO	TEMPERATURAS	REFERÊNCIAS
		ÓTIMAS DE CRESCIMENTO EM PDA (°C)	
<i>Botrytis cinerea</i>	Ascomycota	20-25	Crous <i>et al.</i> (2009)
<i>Venturia Inaequalis</i>	Ascomycota	20-22	Mota (2002)
<i>Ilyonectria macrodidyma</i>	Ascomycota	25	-
<i>Stemphylium</i> sp.	Ascomycota	22-27	Montesinos&Vilardell (1992)

3.1.2 Estirpes de levedura *Pichia pastoris*

Para o trabalho de produção de leveduras em cultura líquida, recorreu-se à coleção de leveduras *P. pastoris* transformadas em trabalhos prévios, conservadas em placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro contendo meio de dextrose (Invitrogen, 2010) à temperatura de 4 °C. As estirpes em estudo são a GS115 e a KM71H, e apresentam classificações diferentes quanto ao fenótipo, apresentando comportamentos diferentes de crescimento em metanol (quadro 5).

Quadro 5: Estirpes de *Pichia pastoris* utilizadas neste estudo

Organismo	Estirpe	Abreviatura	Fenótipo
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	GS	Mut ⁺
	KM71H	KM	Mut ^s

3.1.3 Construções genéticas para síntese de proteínas

Os genes de quitinases ácidas C209, C203 e C525 (anexo 2) foram integrados em duas estirpes de *P. pastoris* GS115 e KM71H. No âmbito de trabalhos anteriores (Mota, 2002; Sousa, 2011) prepararam-se três construções com três genes codificadores de quitinases ácidas de macieira da classe III (C525, C209 e C203, funcionando este último como uma sequência parcial de C209) e o sinal de secreção α -factor de *S. cerevisiae*, e duas construções com os genes C525 e C209 com o sinal de secreção nativo (anexo 3) Estas construções foram clonadas no vetor pPICZ α A (anexo 4) e introduzidas na levedura *P. pastoris*, em duas estirpes, uma estirpe Mut⁺ (GS115) e uma estirpe Mut^s (KM71H). Em paralelo, efetuaram-se transfecções com o plasmídeo vazio. Obtiveram-se colónias positivas para todas as construções, exceto para a C209 com o sinal de secreção nativo (C209XhoNot). Efetuou-se o crescimento em meio líquido destas colónias para a conservação de stocks a -80°C, para posterior produção de secretomas como será explicado no ponto §3.2.1. No seguinte quadro são apresentadas as construções utilizadas na produção de secretomas e respetiva designação adotada

Quadro 6: Construções das proteínas testadas e respetiva notação

ISOFORMAS	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	ABREVIATURAS
C525	XhoI – NotI	C525 XN
	EcoRI – NotI	C525 EN
C209	EcoRI – NotI	C209 EN
C203	EcoRI – NotI	C203 EN
-	Pic	Pic
-	Levedura sem plasmídeo	∅

3.2 Preparação dos secretomas contendo as quitinases a testar

Procura-se com este trabalho estabelecer de uma metodologia de produção de secretomas com proteína quitinase de classe III de macieira previamente clonada em leveduras *P. pastoris*. Para tal foram executados sequencialmente alguns métodos laboratoriais que passam pela indução da produção da proteína heteróloga nas referidas leveduras, diálise dos secretomas em que se verificou o aumento da acumulação proteica significativa, seguindo-se de liofilização, filtração e quantificação proteica pelo método de Bradford.

3.2.1 Indução da síntese de quitinases de macieira

A indução da síntese de quitinase inicia-se através de inoculação de stock de levedura em cultura líquida em meio BMGY para balões de Erlenmeyer. Segundo o protocolo (Invitrogen, 2010) a quantidade de meio BMGY a adicionar em cultura líquida varia consoante a estirpe de leveduras *P. pastoris*: para estirpe GS115 adicionou-se 25 mL e para KM71H adicionou-se 100 mL de BMGY (anexo 5).

Com ansas previamente esterilizadas em etanol e transportadas à chama, retirou-se de placas de Petri contendo as leveduras em estudo, uma pequena quantidade de inóculo que foi adicionada ao meio BMGY mediante agitação da ansa. Os balões foram de seguida colocados na incubadora à temperatura de 30°C a 240 rpm durante 24h.

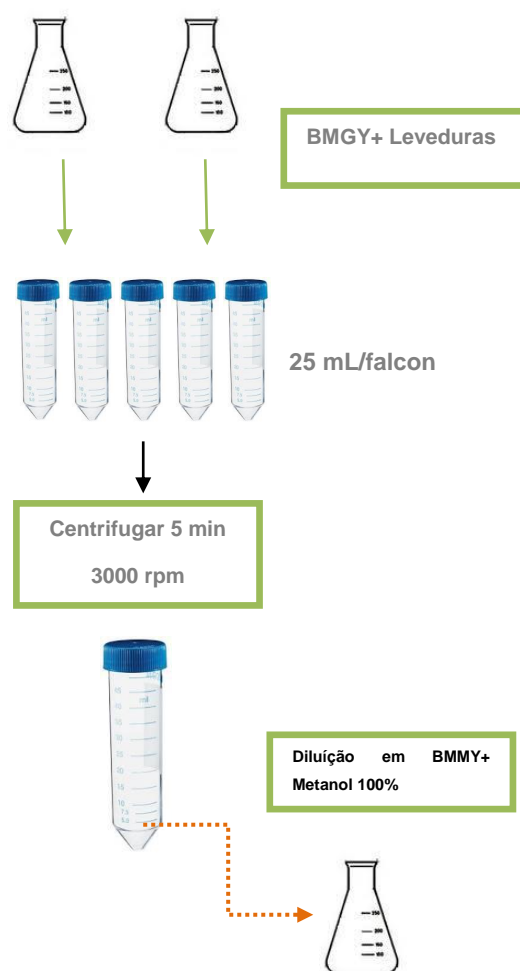


Figura 7: Esquema da mudança de meios de crescimento.

Findo esse período, é feita a monitorização da densidade ótica (OD). Retirou-se uma alíquota de 1 mL da cultura para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL e verificou-se se a OD_{600} (nm) obtida compreendia um valor entre 2-6, uma vez que este parâmetro permite nesta fase indicar o adequado início do crescimento em metanol. Caso contrário, prolongou-se a incubação por 24h ou até obter a OD pretendida (Figura 8). Uma vez obtida, o conteúdo foi transferido para tubos falcon (25 mL por tubo) e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm. Elaborou-se a transferência da cultura de células (*pellet*) para meio BMMY no qual foi diluída e acrescentou-se metanol de forma a obter uma concentração final de 0,5% (Figura 7).

O esquema seguinte apresentado na Figura 8 ilustra as etapas da produção de cultura líquida.

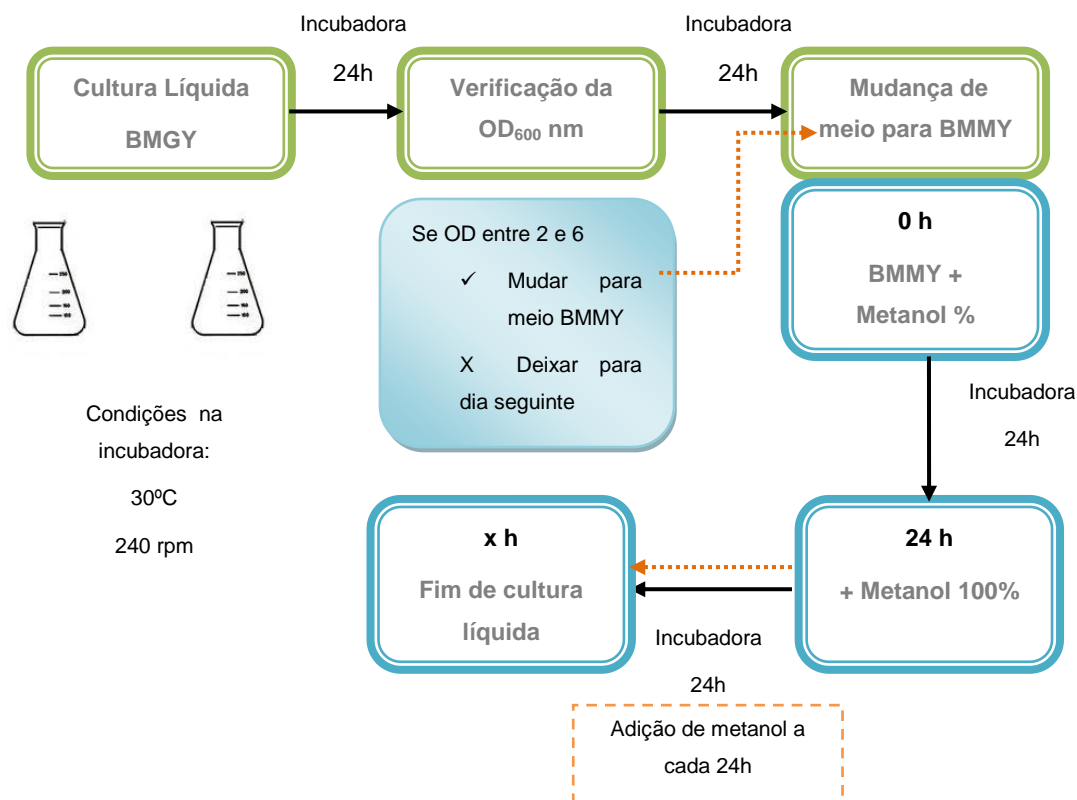


Figura 8: Esquema da produção de leveduras em cultura líquida.

3.2.2 Diálise do secretoma

Após obtenção dos secretomas foi necessário purificar tanto quanto possível a proteína, concentrá-la e eliminar eventuais contaminantes. Procedeu-se deste modo à diálise das amostras, uma vez que se trata de um processo que permite a separação de moléculas de acordo com o seu tamanho através da utilização de membranas semipermeáveis tirando partido do gradiente de concentração. As membranas foram previamente lavadas (anexo 6), de seguida conservadas em água destilada à temperatura de 4 - 8°C. Encheram-se as membranas com as amostras de secretomas e ataram-se com fio nas extremidades e prenderam-se com molas, e colocaram-se em tinas de vidro com cerca de 5 L com água destilada tapadas com celofane, duas membranas por tina. A diálise decorreu com agitação em câmara frigorífica à temperatura de cerca de 4-6°C durante 24h (figura 9). A água das tinas era mudada uma vez durante a diálise.



Figura 9: Diálise (original da autora).

3.2.3 Liofilização do secretoma

A liofilização foi efetuada no sentido de obter uma maior concentração nas amostras, uma vez que em trabalhos prévios se verificou ser necessária para posteriores ensaios bioquímicos e biológicos (Sousa, 2011). Foi realizada em dois liofilizadores disponíveis com sistemas de funcionamento distintos.

No primeiro (figura 10a) o conteúdo das membranas de diálise foi transferido para tubos falcon de 50 mL com cerca de 7 mL de amostra, com perfurações na tampa que foram colocados no congelador à temperatura de -24°C . Quando completa a congelação, inseriram-se os tubos no liofilizador ligeiramente inclinados deixando a liofilizar *overnight*. Findo o processo de liofilização, foram adicionados 500 μL de água destilada esterilizada. No segundo liofilizador (figura 10b) adicionou-se cerca de 25 mL aos balões de liofilização de amostra e colocaram-se igualmente em congelador à temperatura de -24°C antes de se liofilizar. Procedeu-se depois à liofilização, durante o mesmo período considerado, sendo de seguida também adicionada água destilada esterilizada ao liofilizado na mesma proporção.

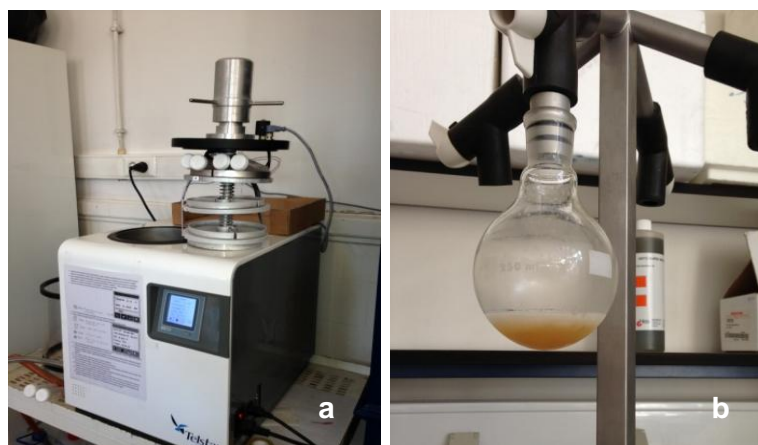


Figura 10: Liofilizadores a) b) Hetto Drywiner F.D 1.0-60E
(original da autora).

3.2.3 Filtração do secretoma

O processo de filtração foi efetuado no sentido de eliminar eventuais contaminações na solução proteica, decorrentes do manuseamento nas anteriores etapas, uma vez que em ensaios preliminares de inibição micelial verificou-se a ocorrência de contaminações variadas. Posto isto, surgiu a necessidade de adicionar esta etapa ao procedimento. A filtração foi realizada através de seringas com filtros ajustáveis e esterilizados de 0,22 μm , assepticamente (Figura 11).



Figura 11: Filtração
(original da autora).

3.2.4 Quantificação proteica

Este método permite quantificar a proteína solúvel presente nas amostras (Bradford, 1976), uma vez que contém o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* que existe em duas formas de cor, vermelho e azul. A mudança de cor (do vermelho para azul) ocorre quando este reagente é estabilizado na ligação a proteínas, e o seu máximo de absorção varia de 465 nm para 595 nm (figura 13).

A cada 20 µL de amostra é adicionado 1 mL de reagente de *Bradford* da firma Bio-rad previamente diluído (1/5) e filtrado. A partir da curva padrão com várias concentrações conhecidas de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) é possível calcular a quantidade proteica das amostras em estudo, por extrapolação.



Figura 12: Reagente de Bradford
(original da autora).

3.3 Ensaios de eficácia biológica de secretomas com quitinases ácidas de macieira

No estudo da eficácia biológica de quitinases ácidas de macieira da classe III, a metodologia utilizada foi semelhante à dos ensaios desta natureza para fungicidas. Iniciaram-se os ensaios de eficácia testando várias construções de quitinases (Quadro 6 do ponto §3.1.3) em *B. cinerea* e posteriormente, os secretomas que proporcionaram melhores resultados (maior inibição de crescimento micelial) foram testados em *V. inaequalis*, *I. macrodydima* e *Stemphylium* sp.

3.3.1 Inibição do crescimento micelial

No estudo da inibição do crescimento micelial recorreu-se à técnica do meio tóxico referida por Tomaz (1958), habitualmente usada na avaliação de fungicidas (Bizarro, 2012; Farropas, 2003; Vaz, 2008). A avaliação da eficácia de um fungicida faz-se comparando o crescimento do fungo em meio gelosado contendo fungicida e o crescimento do fungo em meio semelhante na ausência do fungicida. Deste modo para testar a eficácia dos enzimas quitinases ácidas de macieira de classe III, adotando o mesmo método, selecionou-se PDA para meio de cultura dos ensaios, por ser frequentemente usado neste tipo de estudos. Testaram-se várias construções de proteína, uma por ensaio, tendo-se utilizado em cada

ensaio seis concentrações diferentes reportadas à concentração de substância ativa, mais uma testemunha em que não foi adicionado secretoma ao meio de cultura.

As concentrações de proteína no secretoma inicialmente escolhidas para as diluições foram as seguintes: 5×10^{-6} , 1×10^{-6} , 5×10^{-7} , 1×10^{-7} , 5×10^{-8} , 1×10^{-8} mg/L. Foi preparada uma solução mãe com a proteína, com uma concentração da mesma que equivale a 10 mg/L (1 mg/ 100 mL de solução) num balão volumétrico de 100 mL. Seguidamente aplicou-se o método das diluições sucessivas como consta na figura 13, obtendo-se as concentrações anteriormente referidas. Cada uma das diluições foi adicionada e homogeneizada ao meio de cultura esterilizado e anteriormente arrefecido em banho-maria, à temperatura de 45-50°C. O meio foi preparado de modo a que a concentração final de PDA fosse sempre semelhante, 3,9 g em 100 mL. Posteriormente, distribuiu-se a mistura assepticamente por seis placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro, à razão de 15 mL por placa, totalizando seis repetições por isolado e concentração. Nas placas testemunha foi utilizada água destilada e esterilizada, em substituição das diluições de proteína, e a concentração de PDA no meio foi também de 3,9 g por 100 mL. Após a solidificação do meio, realizou-se a inoculação das placas com os isolados dos fungos em estudo, colocando um disco micelial de 3 mm de diâmetro no centro de cada uma (figura 14). Os discos foram retirados da periferia de culturas de crescimento em estufa de incubação regulada para a temperatura mais conveniente ao estudo em causa.

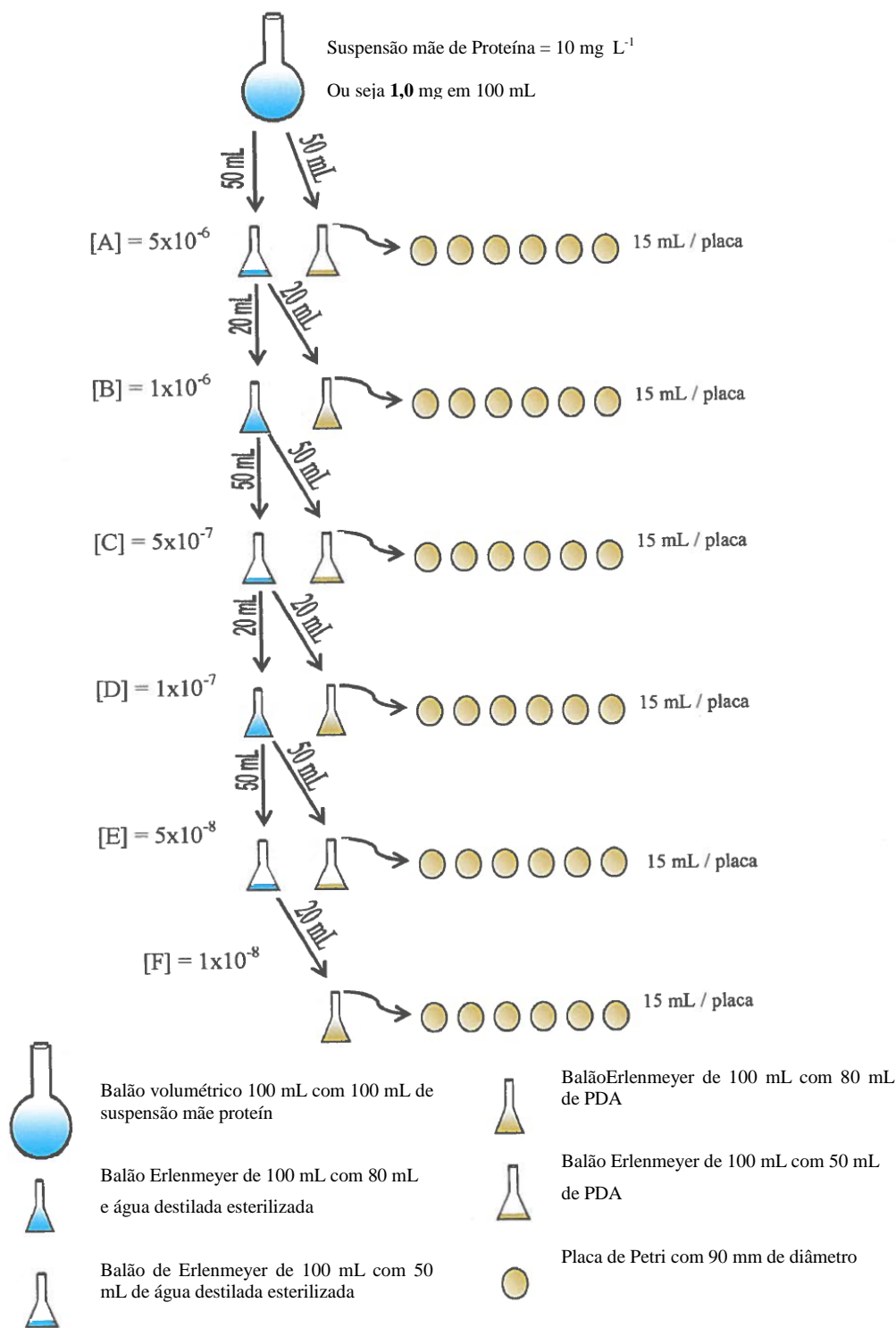


Figura 13: Esquema de preparação do método do meio tóxico utilizado e respectivas concentrações para 10 mg L^{-1} (Adaptado de: Farropas (2003))

Após inoculação, foram colocadas as placas em condições de temperatura variável consoante o ensaio: em estufa a 20°C ou a 26°C , em condições de obscuridade ou à temperatura ambiente consoante o ensaio, até se atingir um diâmetro considerável na placa. Ao fim de vários dias de incubação, que variaram consoante os fungos em estudo, calculou-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (I) através da fórmula de

Bateman e Vicent, $I = 100 \times (C-T) / C$, em que C representa o crescimento micelial da testemunha, em mm e o T, o crescimento micelial nas placas tratadas, em mm (Horsfall, 1956). Para alguns ensaios repetiu-se o mesmo procedimento mas para uma nova concentração de solução mãe equivalente a 25 mg/L (2,5 mg/ 100 mL de solução).

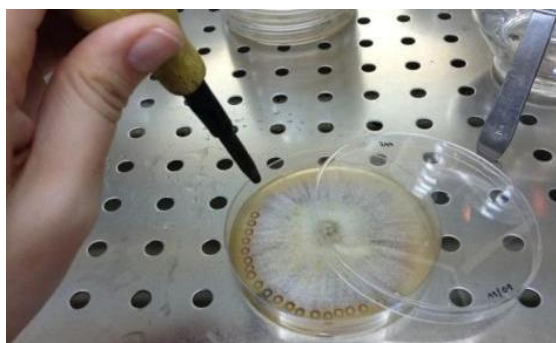


Figura 14: Marcação dos discos miceliais num isolado de *Ilyonectria* (original da autora).

Para realizar a análise dos valores da percentagem da inibição do crescimento micelial, utilizou-se a transformação “probit”. Os “probits” são unidades de probabilidade dispostas numa escala de 10, imaginada por Bliss (1934) derivadas de “desvios equivalentes normais”, tendo por unidade o desvio padrão (Shepard, 1951). Os valores transformados colocados em relação com o logaritmo da concentração de fungicida, permitem transformar numa reta, a curva sigmóide que originalmente relaciona a percentagem de inibição com a concentração. Para evitar valores negativos de logaritmos, multiplicaram-se os valores das concentrações por um fator constante (1×10^{-8}). Deste modo, é possível determinar a reta de regressão, isto é, a relação linear existente entre as concentrações de proteína do ensaio e as percentagens de inibição obtidas. É de salientar que este método só é aplicável uma vez que as percentagens de inibição se verifiquem entre 20 – 80%. Para a análise dos dados foi utilizado o programa EXCEL na análise de regressão linear e sua representação gráfica. Quando aplicável, para cada reta de regressão foram determinados o coeficiente de determinação (R^2), a equação da reta ($Y = a + bX$), em que b representa o declive da mesma, e o valor de CE_{50} .

O coeficiente de determinação (R^2) consiste numa medida de precisão da reta de regressão que indica que os valores experimentalmente obtidos estão melhor adaptados ao modelo, quanto mais próximo o seu valor se encontrar da unidade. Os valores de CE_{50} e de b permitem comparar os fungicidas usados, sendo o primeiro utilizado para comparação da eficácia, enquanto o segundo se emprega para comparar o modo de ação do fungicida (Tomaz, 1958). O valor CE_{50} representa a abcissa do ponto que tem por ordenada o valor de 50% de inibição, ou seja, “probit” igual a 5. O declive da reta de regressão (b) é uma estimativa de $1/\sigma$, sendo σ o desvio padrão. Mede-se pelo aumento de unidades em ordenadas, “probits”, correspondentes ao aumento de uma unidade em

abscissas, logaritmo da concentração (Finney, 1951). Declives baixos mostram uma escassa variação de sensibilidade do indivíduo, enquanto declives elevados evidenciam uma grande variação de sensibilidade. Deste modo, o declive da reta é considerado como um indicador do mecanismo de ação do produto, ainda assim, a simples circunstância de ser igual para dois produtos, quando ensaiados com o mesmo fungo, não permite concluir que estes tenham um mecanismo de ação idêntico (Horsfall, 1956).

3.3.2 Inibição da germinação de esporos

Para avaliar a eficácia biológica de quitinases de macieira de classe III realizou-se também ensaio de inibição de esporos de *B. cinerea*. Esta técnica tem por base o método de diluições sucessivas em tubos de ensaio descrita por Tomaz (1958) com algumas alterações com base em ensaios elaborados por Olaya e Köller (1999).

Segundo Tomaz (1958), o método pode ser descrito pela incorporação de esporos em várias diluições do fungicida. Antes da aplicação da técnica mencionada foi necessário elaborar ensaios de determinação do período de incubação para ocorrência de germinação dos esporos. Com base nos ensaios realizados por Olaya e Köller (1999), considerou-se que a germinação era atingida na presença de 80% dos esporos com emissão do tubo germinativo. Para o fungo *B. cinerea*, esta percentagem foi atingida em água destilada ao fim de 6h em estufa, à temperatura de 20°C, em condições de obscuridade.

Foi testada uma construção de proteína por ensaio, considerando a que melhores resultados apresentou em ensaios de inibição micelial, tendo sido utilizadas as mesmas concentrações referidas nesses ensaios, mais a testemunha. Foi preparada uma suspensão mãe com o dobro da concentração de proteína pretendida (10 mg L⁻¹, isto é 1 mg de proteína em 100 mL de solução), e assim sucessivamente nas diluições, visto posteriormente haver uma diluição de 1:2, devido à adição da suspensão conidial (150 µL de diluição da proteína mais 150 µL da suspensão conidial, perfazendo um volume total de 300 µL). O procedimento seguido baseou-se em Farropas (2003), que se encontra ilustrado na figura 15.

Para a obtenção das suspensões de esporos do fungo *B. cinerea*, utilizaram-se culturas com 13 dias de crescimento, de modo a obter a quantidade de esporos necessária ao ensaio. Estas cresceram em placas de Petri de 90 mm de diâmetro com 15 mL de PDA, à temperatura de 20°C em condições de obscuridade. Com o auxílio de uma ansa esterilizada, raspou-se o micélio obtido para dentro de um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada. Agitou-se o tubo no vortex de modo a desprender e promover a libertação dos conídios e sucessivamente homogeneizar a suspensão. Seguidamente, a suspensão foi filtrada com um filtro para esporos de malha nº1 de modo a eliminar restos de micélio. Por fim, realizaram-se as diluições sucessivas das suspensões conidiais de forma a obter 100 a 120 esporos por campo microscópico na ampliação 160x.

Retirou-se 150 μL de cada uma das suspensões conidiais obtidas, às quais se adicionou 150 μL de cada concentração de proteína obtida nas diluições, contidas em tubos de microcentrífuga de 1 mL, perfazendo 300 μL . Todos os tubos foram agitados no vortex, para tornar a mistura homogênea e de cada um retiraram-se quatro gotas de 60 μL que foram colocadas diametralmente opostas na superfície de placas de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro. Na testemunha foi utilizada água destilada esterilizada, em substituição das diluições de proteína. Após incubação em estufa a 20°C durante 6h na obscuridade, colocou-se sobre cada gota uma lamela de 22x22 mm.

A análise dos resultados foi semelhante à realizada para os resultados obtidos nos ensaios de inibição do crescimento micelial dos fungos.

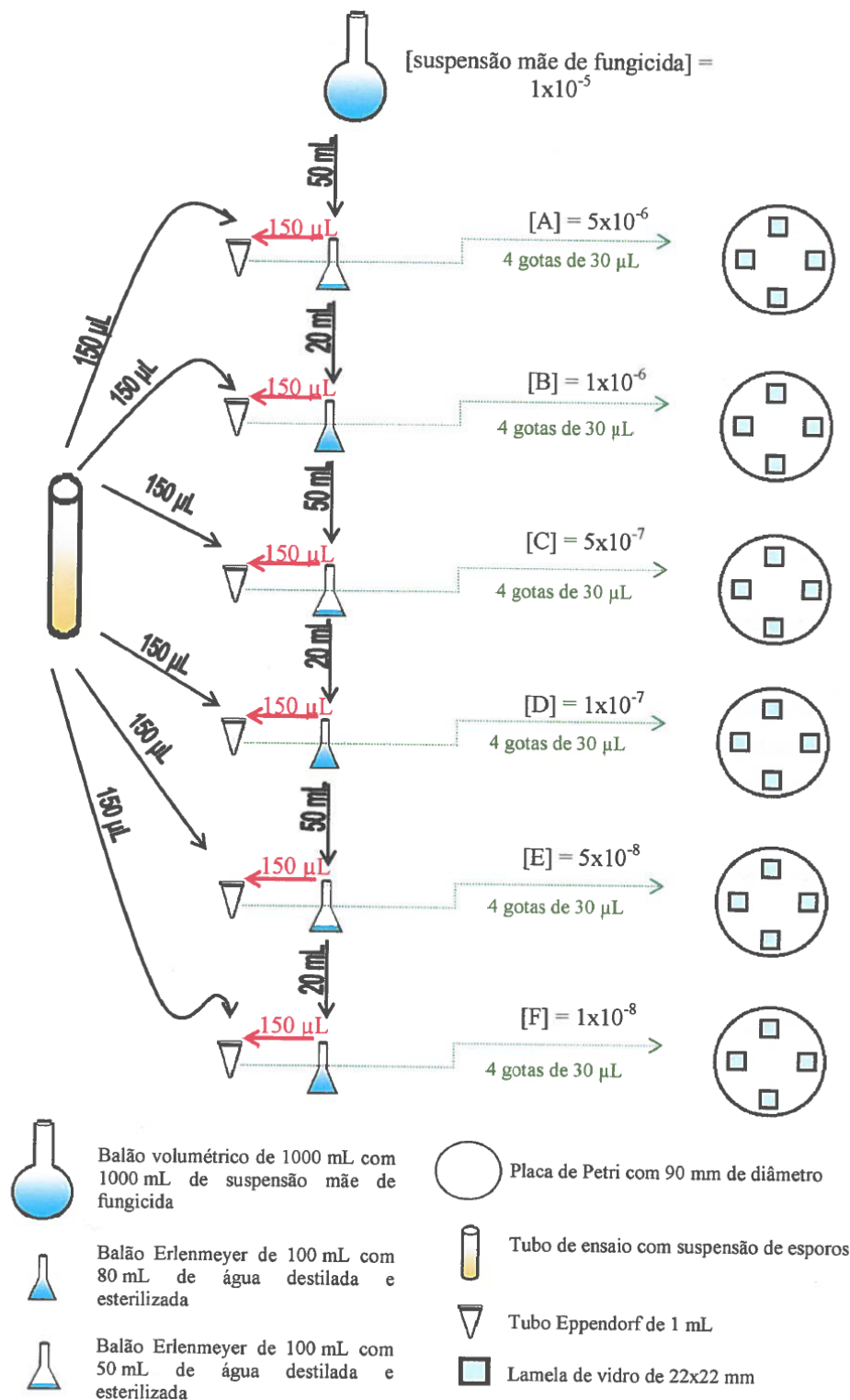


Figura 15: Esquema do procedimento semelhante ao usado no ensaio da inibição da germinação de esporos de *Botrytis cinerea* (Fonte: Farropas, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de Secretomas

No âmbito do projeto “Avaliação das propriedades de defesa de quitinases da macieira” foi realizado o processo de clonagem e produção de quitinases ácidas de macieira em levedura *P. pastoris* (Sousa, 2011). A transformação envolveu a elaboração de construções com três genes codificadores de quitinases ácidas de macieira da classe III (C525, C209 e C203) com sinais peptídicos diferentes: o sinal de secreção α -factor de *S. cerevisiae*, e duas construções com os genes C525 e C209 com o sinal de secreção nativo. Foram ainda realizadas duas transformações de controlo, uma com a levedura sem plasmídeo e outra com o plasmídeo vazio (Pic). As construções de proteína utilizadas encontram-se representadas no quadro 6 do ponto § 3.1.3. Posteriormente, foram feitos ensaios de crescimento de culturas líquidas de leveduras e criado um stock de secretomas, pela Dr.^a Mariana Mota e Eng.^a. Tânia Genebra. Estes stocks foram utilizados recorrentemente para a produção de secretomas para ensaios de inibição micelial, sendo essa produção efetuada paralelamente à realização dos mesmos. De seguida, é apresentado o quadro 7, que representa e relaciona as amostras das construções utilizadas por ensaio cultura líquida/inibição micelial e os parâmetros relevantes como as horas de crescimento (h), monitorização da OD₆₀₀ (nm) e quantidade de proteína (mg/mL). Para facilitar a compreensão, adotou-se numeração romana para os ensaios de cultura líquida de leveduras para a produção de secretomas.

Quadro 7: Secretomas produzidos para os ensaios de eficácia biológica – inibição micelial.

Número do Ensaio	Ensaio	Proteína	Horas de Crescimento	Ensaio Secretomas	Horas (h)	OD ₆₀₀ (nm)	Proteína mg/ mL	Ensaio Válidos
1	GS0	GS \emptyset	48	II	48	9,16	-	+
2	GS1	GS C209 EN	48	II	48	3,60	-	+
3	KM0	KM+ Pic	72+96**	II	24	18,84	0,0297	
					48	20,26	0,0685	
					72	19,50	0,0872	
					96	22,62	0,1841	
4	KM1	KM C525EN	48	II	=KM2	-	-	
5	KM2	KM C525 EN	72	II	24	12,76	0,0893	
					48	14,7	0,2570	
					72	16,7	0,1425	
6	KM3	KM Pic	48	II	24	18,84	0,0297	
					48	20,26	0,0685	
7	KM4	KM \emptyset	96	II	24	15,06	0,0318	
					48	17,10	0,0358	
					72	17,02	0,0358	
					96	20,20	0,0603	

Quadro 7: Secretomas produzidos para os ensaios de eficácia biológica – inibição micelial (Cont.)

Número do Ensaio	Ensaio	Proteína	Horas de Crescimento	Ensaio Secretomas	Horas (h)	OD ₆₀₀ (nm)	Proteína mg/ mL	Ensaio Válidos
8	KM5	KM C525 EN	24	II	24	17,76	0,0893	
9	GS6	GS C525 EN	72	VIII	0	1,546	0,1360	
					24	2,95	0,1511	
					48	3,13	0,1253	
					72	1,789	0,2570	
10	GS7	GS C209 EN	120	IV	24	3,06	0,0582	
					48	4,52	0,0830	
					72	5,28	0,1731	
					96	6,14	0,2570	
					120	7,48	0,4022	
11	GS8	GS C525 XN	120+96**	IV	24	1,56	0,0399	+
					48	5,44	0,0747	
					72	6,3	0,0726	
					96	0,78	0,0998	
					120	2,88	0,1231	
12	GS9	GS C209 EN	96	IV	24	3,06	0,0582	+
					48	4,52	0,0830	
					72	5,28	0,1731	
					96	6,14	0,2570	
13	GS10	GS C525 XN	120	IV	24	1,56	0,0399	+
					48	5,44	0,0747	
					72	6,3	0,0726	
					96	0,78	0,0998	
					120	2,88	0,1231	
14	GS11	GS ø	96	IV	24	5,28	0,0217	+
					48	8,56	0,0419	
					72	12,16	0,0603	
					96	11,52	0,0768	
15	GS12	GS C525 XN	48	VIII	0	1,036	0,1468	
					24	3,138	0,1274	
					48	2,02	0,2270	
16	GS13	GS C203 EN	144	IX	0	1,15	0,1381	
					24	2,62	0,3314	
					48	2,999	0,2664	
					72	3,15	0,3094	
					96	3,208	0,2806	
					120	3,108	0,2501	
					144h	3,104	0,3070	
17	GS14	GS C209 EN	144	IX	0	1,156	0,1381	+
					24	2,574	0,1511	
					48	2,997	0,1468	
					72	3,376	0,5337	
					96	3,38	0,2641	
					120	3,284	0,2224	
					144h	3,336	0,2688	
18	GS15	GS C203 EN	144	IX	= GS13	-	-	+

Quadro 7: Secretomas produzidos para os ensaios de eficácia biológica – inibição micelial (Cont.)

Número do Ensaio	Ensaio	Proteína	Horas de Crescimento	Ensaio Secretomas	Horas (h)	OD ₆₀₀ (nm)	Proteína mg/ mL	Ensaio Válidos
19	GS16	GS C209 EN	144	IX	=GS14	-	-	
20	KM6	KM C209 EN	48	VII	0	1,051	0,2408	
					24	2,36	0,1082	
					48	2,752	0,2270	
21	KM7	KM C209 EN	48	VII	=KM6	-	-	+
22	KM8	KM C209 EN	48	VII	=KM6	-	-	+
23	KM9	KM C203 EN	72	IX	0	1,152	Final 0,782	
					24	2,83		
					48	3,118		
					72	3,2		
24	KM10	KM C203 EN	72	IX	=KM9	-	-	
25	KM11	KM C203 EN	144	IX	=KM9	-	-	
26	GS18	GS C203 EN		IX	=GS13	-	-	+
27	KM12	KM C203 EN	144	IX	=KM9	-	-	+
28	GS19	GS Pic	48	XIV	48h	2.788	0,2958	+
29	GS20	GS C525 EN	72	XII	0	1,132	0,2270	+
					24	2,906	0,2420	
					48	2,630	0,2524	
					72	2,700	0,2651	
30	KM13	KM C203 EN	144	IX	=KM9	-	-	
31	KM14	KM C203 EN	144	IX	=KM9	-	-	

*= na coluna referente às horas indica que a construção usada e os respetivos valores são semelhantes ao ensaio mencionado

** Ensaio de inibição micelial com mistura de amostras obtidas a diferentes horas de crescimento

***Símbolo + indica quais os ensaios de inibição micelial válidos sem contaminações

Nos ensaios 3 e 11 foram utilizados secretomas combinados de tempos de crescimento diferentes, no primeiro 72h+96h, e no segundo 120h+96h por uma questão de disponibilidade de stock. Neste processo de produção de secretomas procedeu-se à variação dos tempos de crescimento na incubadora como se verifica na coluna horas (h), acompanhada da verificação da OD₆₀₀ (nm) com uma periodicidade de 24h. Mantinham-se as culturas em incubadora enquanto a OD não aumentava. Os resultados obtidos, evidenciando variações de crescimento para os mesmos tempos e condições de cultura sugerem que nem sempre as leveduras se multiplicam da mesma forma. Apesar da inoculação inicial no meio de indução ser feita a OD semelhante, o meio e o tempo de crescimento serem também semelhantes, a acumulação de proteína extracelular variou de ensaio para ensaio (na mesma construção). Este facto poderá dever-se às leveduras estarem em fases de crescimento diferentes quando se inicia a indução. É também de notar que, em determinados ensaios surgiram oscilações com aumento e diminuição da quantidade proteica da solução, como é possível observar nas amostras de secretomas utilizadas nos ensaios de inibição número 11, 13, 15, 16 e 17. Estas oscilações ocorrentes

em várias horas de produção (máximo período testado até às 144h) podem estar relacionadas com morte/autólise das células no meio havendo destruição da proteína produzida. Uma vez aumentada a produção de proteína, esta pode originar ciclos de digestão da parede de levedura, e a partir de x horas possivelmente ocorre degradação das células de *P. pastoris* justificando deste modo o decréscimo/aumento de produção de proteína.

Um dos objetivos nesta etapa era perceber qual a estirpe que realizava melhor expressão e otimizar os tempos de produção. O quadro que se segue (Quadro 8) resume as construções que deram resultados mais promissores, em termos de proteína secretada.

Quadro 8: Valores máximos de proteína (mg/mL) e respetiva construção, obtidos por estirpe

ESTIRPE	CONSTRUÇÃO	PROTEÍNA (mg/ mL)	ENSAIO DE INIBIÇÃO
		Valores finais máximos obtidos	MICELIAL CORRESPONDENTE
KM71H	KM C525 EN 48h II	0,2570	KM1
	KM C209 EN 48h II	0,2270	KM6
GS115	GS C209 EN 120h IV	0,4022	GS7
	GS C203 144h IX	0,3070	GS13

Pela observação do Quadro 8 verifica-se que os melhores resultados de quantidade proteica para a estirpe KM71H foram para as construções C525 EN e C209 EN, ao fim de 48h de crescimento em cultura líquida, atingindo a primeira um máximo de 0,2570 mg de proteína por mL de solução. Contudo foi com a estirpe GS115 que os valores de proteína produzida foram mais elevados. Esta estirpe permitiu maior acumulação de proteína e em tempos de crescimento em cultura líquida superiores (120h e 144h). As construções/isoformas mais eficientes foram C203 EN e C209 EN, tendo a última obtido o valor máximo de quantidade proteica de 0,4022 mg/mL de solução. Esta diferença de atividade secretora entre estirpes, é explicada pelo facto de a estirpe GS115 ser do tipo Mut⁺, isto é, capaz de utilizar metanol como única fonte de carbono e expressar melhor em metanol do que a estirpe KM71H, Mut^s, de utilização lenta do metanol e menor crescimento em meio metanólico.

A maior eficiência verificada em construções do tipo EN (sinal peptídico de *S. cerevisiae*) não permite retirar grandes conclusões, pois para estas isoformas, não se dispunha da construção XN (sinal peptídico da macieira). No entanto, é de salientar que vai de encontro ao que refere a bibliografia (sinal peptídico da *S. cerevisiae* melhor sucedido).

Uma vez que os melhores resultados em estirpe KM71H foram produzidos até às 48h de crescimento em metanol, convencionou-se que nos ensaios subsequentes de expressão heteróloga se mantivesse o mesmo período de crescimento (Quadro 9).

No entanto, como demonstraram baixo teor proteico, e pela ocorrência de quebra de um dos balões no ensaio XVIII na incubadora (impossibilitando o seu posterior uso), finalizou-se o mesmo ensaio no período de 24h em crescimento em metanol. Os secretomas resultantes da execução destes ensaios não foram utilizados em posterior avaliação da sua atividade antifúngica, tendo sido armazenados em stock à temperatura de -80°C.

Quadro 9: Ensaios de produção de secretomas finais (produzidos pela autora)

ENSAIO	CONSTRUÇÃO	ESTIRPE	HORAS	OD	PROTEÍNA (Bradford) mg/ml
XVII	C209 EN	KM71H	0h	1,790	0,186
			24h	2,964	0,230
			48h	2,628	0,270
	C203 EN	KM71H	0h	1,400	0,208
			24h	2,864	0,243
			48h	2,584	0,206
XVIII	C209 EN	KM71H	0h	1,428	1,866
			24h	1,480	0,175
	C203 EN	KM71H	0h	1,346	1,78
			24h	1,482	0,174

4.2 Eficácia biológica de secretomas com quitinases ácidas de macieira

4.2.1 Ensaio de inibição micelial

Os ensaios de inibição micelial foram realizados consoante disponibilidade em quantidade de secretomas em estudo. Os primeiros ensaios foram elaborados com o fungo *B. cinerea*, uma vez que se trata de um fungo que ataca diversas culturas tanto hortícolas como fruteiras e tem um crescimento rápido, tendo sido alvo de alguns estudos deste tipo (Brzezinska & Jankiewicz, 2012; Huynh *et al.*, 1992).

Inicialmente efetuaram-se ensaios preliminares com secretoma filtrado (ensaio GS0 e GS1) e não filtrado (ensaio KM0 e KM1) testando proteínas provenientes das duas estirpes de levedura *P. pastoris*, GS115 e KM71H com a dosagem proteica de 10 mg/L (1 mg/ 100 mL de solução) na solução mãe, a partir da qual foram feitas as diluições sucessivas. Verificou-se que foi importante a realização de filtração prévia, uma vez que nos ensaios KM0 e KM1 observou-se a ocorrência de contaminações, presentes em maior abundância nas placas cuja concentração era maior, sugerindo ter a sua origem no secretoma adicionado. Deste modo, foi introduzida a etapa da filtração (ponto §3.2.3) à metodologia anteriormente estabelecida. Nos ensaios seguidamente realizados, todas as soluções proteicas analisadas foram previamente liofilizadas e filtradas com filtros esterilizados de 0,22 µm. As temperaturas a que os ensaios foram realizados dependeram da disponibilidade de estudos e da ocorrência de problemas com contaminações exógenas.

De seguida apresenta-se o quadro 10, com todas as construções testadas por ensaio de inibição micelial (incluindo os ensaios preliminares), o fungo em estudo, temperatura e quantidade inicial administrada na solução mãe para perfazer a concentração pretendida. Na última coluna a sinalização (+) corresponde aos ensaios válidos, isto é, sem contaminações e passíveis de serem medidos. É sobre estes que incidirá a análise dos restantes resultados.

Quadro 10: Ensaios de Inibição micelial realizados

Número do Ensaio	Ensaio	Proteína	Horas	Ensaio de Secretomas	Quantidade (mg)	Fungo	Temp. (°C)	Ensaios Válidos
1	GS0	GS ø	48	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
2	GS1	GS C209 EN	48	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
3	KM0	KM Pic	72+96	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
4	KM1	KM C525 EN	48	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
5	KM2	KM C525 EN	72	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
6	KM3	KM Pic	48	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
7	KM4	KM ø	96	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
8	KM5	KM C525 EN	24	II	1	<i>B. cinerea</i>	20	
9	GS6	GS C525 EN	72	VIII	1	<i>B. cinerea</i>	20	
10	GS7	GS C209 EN	120	IV	1	<i>B. cinerea</i>	20	
11	GS8	GS C525 XN	120+96	IV	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
12	GS9	GS C209 EN	96	IV	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
13	GS10	GS C525 XN	120	IV	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
14	GS11	GS ø	96	IV	1	<i>B. cinerea</i>	20	+
15	GS12	GS C525 XN	48	VIII	1.8	<i>B. cinerea</i>	20	
16	GS13	GS C203 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	26	
17	GS14	GS C209 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	26	+
18	GS15	GS C203 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	26	+
19	GS16	GS C209 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	25-27	
20	KM6	KM C209 EN	48	VII	2.5	244	20	
21	KM7	KM C209 EN	48	VII	2.5	244	T.ambiente	+
22	KM8	KM C209 EN	48	VII	2.5	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	+
23	KM9	KM C203 EN	72	IX	2.5	<i>Stemphylium</i> spp.	T.ambiente	
24	KM10	KM C203 EN	72	IX	2.5	<i>V. inaequalis</i>	T.ambiente	
25	KM11	KM C203 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	
26	GS18	GS C203 EN	144	IX	1	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	+
27	KM12	KM C203 EN	144	IX	2.5	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	+
28	GS19	GS Pic	48	XIV	1	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	+
29	GS20	GS C525 EN	72	XII	1	<i>B. cinerea</i>	T.ambiente	+
30	KM13	KM C203 EN	144	IX	2.5	<i>V. inaequalis</i>	T.ambiente	
31	KM14	KM C203 EN	144	IX	2.5	<i>V. inaequalis</i>	T.ambiente	

Pela observação do quadro é notório que a quantidade de ensaios válidos foi bastante inferior ao número de ensaios realizados. Foi elaborada a seleção das amostras dos secretomas à medida que estas ficavam disponíveis e processados na diálise, liofilização e filtração. Contudo, apesar das limitações procurou-se de algum modo que fossem testadas pelo menos todas as construções de proteína da estirpe GS115 no fungo *B. cinerea*, para 10 mg/ L de solução mãe, para posterior diluição, uma vez que se mostrou a estirpe mais eficaz em termos de teor proteico. Na sequência das contaminações observadas, que conduziram à perda de grande parte dos resultados referentes às diferentes construções, repetiram-se alguns ensaios, como mencionado no quadro. Esta repetição tentou substituir os ensaios inválidos, de acordo com a proteína em quantidade disponível em stock.

No final da incubação de cada ensaio válido, as medições foram feitas e calculadas as percentagens máximas de inibição. Devido ao facto de, na grande maioria dos ensaios validados os valores experimentais não se aproximarem dos valores exigidos para a transformação em probits, uma vez que as percentagens de inibição micelial devem encontrar-se entre 20-80 % para que possa ser aplicada (Farropas, 2003), elaborou-se o quadro 11, em que foram registados os valores de percentagem de inibição do crescimento micelial para o fungo *B. cinerea*.

Quadro 11: Percentagens de inibição micelial dos ensaios realizados com o fungo *Botrytis cinerea*

PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO MICELIAL (%)													
Conc.	Proteína inicial: 10 mg L ⁻¹ Estirpe GS115									25 mg L ⁻¹ Estirpe GS115		25 mg L ⁻¹ Estirpe KM71H	
	GS0	GS1	GS8	GS9	GS10	GS11	GS18	GS19	GS20	GS14	GS15	KM8	KM12
A	22.16	24,60	3.58	58.03	12.27	21.42	8.54	9.52	2.06	16.37	30.81	0.00	7.68
B	2.89	23,96	3.58	35.78	5.54	11.31	4.27	3.35	2.41	10.59	16.37	0.00	2.29
C	5.25	3,85	2.03	34.82	8.30	9.15	1.20	3.47	3.78	11.14	6.88	0.00	2.75
D	2.57	0,11	2.32	12.67	10.83	11.67	0.40	0.26	2.98	4.40	17.06	0.00	3.10
E	8.78	8,88	1.74	9.77	12.64	7.10	4.14	2.06	2.52	10.59	12.10	0.00	4.01
F	1.82	0,11	1.06	5.13	6.74	7.34	4.14	0.64	4.59	3.71	19.26	0.00	2.18

*Conc. – concentrações das diluições efetuadas

Nos dois primeiros ensaios realizados, GS0 (GS \emptyset) e GS1 (C209 EN), as percentagens de inibição foram baixas para as construções. Uma vez comparados, obteve melhor valor o

correspondente à construção GS C209 EN, atingindo 24,6% de inibição na concentração mais alta, podendo indiciar algum potencial inibidor desta construção. O resultado de 22,26% para a maior concentração na construção GS \emptyset pode indicar que o extrato de levedura sem secreção heteróloga terá também algum potencial inibidor, ligeiramente mais reduzido que o GS C209 EN, mas com diferenças claras em relação à testemunha, o que parece sugerir a ocorrência de algum efeito inibidor, pela existência de levedura por si só.

Seguidamente realizou-se uma série de ensaios com o mesmo fungo para os secretomas disponíveis, começando por serem testados aquelas cuja proveniência era a estirpe GS115, com uma concentração de 10 mg/ L de solução mãe nos ensaios de inibição micelial.

Os ensaios decorreram inicialmente em estufa à temperatura controlada de 20°C, em condições de obscuridade. Dada a ocorrência de contaminações frequentes, nos seguintes ensaios para a mesma concentração inicial, fez-se variar as condições de temperatura, primeiro para 26°C (estufa tendencialmente descontaminada) e depois, colocando as placas seladas com parafilme à temperatura ambiente.

Pela observação dos valores do quadro 11, verifica-se que a construção que demonstrou melhor resultado de inibição foi a GS C209 EN correspondente ao ensaio GS9, evidenciando uma inibição de 58,03% na concentração mais elevada (figura 16). Foi também a construção que apresentou uma gama de valores mais coerentes de inibição/diluição, pelo que a título meramente teórico e com a ressalva de que as medidas probits só podem ser estabelecidas na presença de percentagens na gama dos 20-80% em todas as concentrações de diluição, apresenta-se a correspondente reta de regressão obtida para o mencionado ensaio (Figura 17).

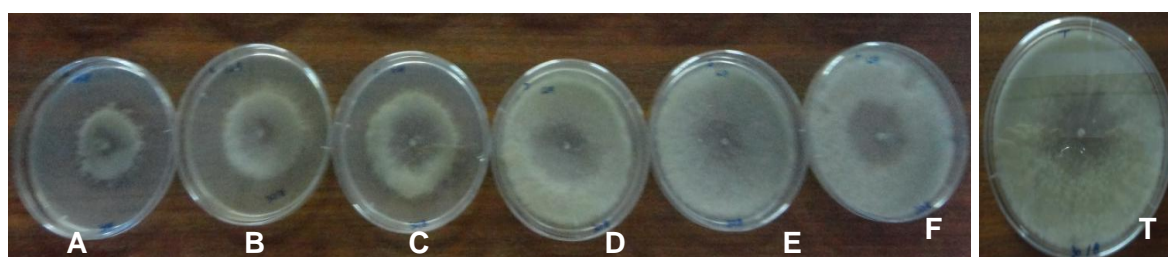


Figura 16: Ensaio de inibição micelial GS9 com *B. cinerea* (Construção GS C209 EN)
(original da autora).

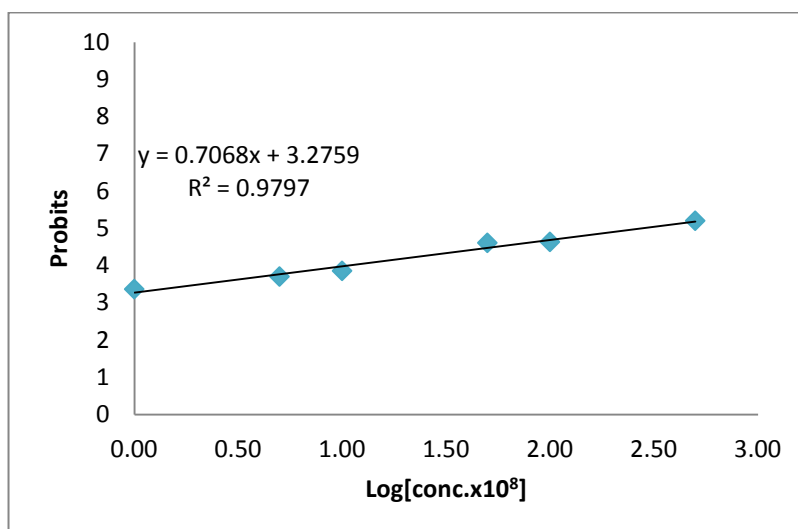


Figura 17: Eficácia de diferentes concentrações do secretoma (em mg de proteína /mL) GS C209 EN (IV,96h) utilizada no ensaio GS9 de inibição do crescimento micelial (probit) de um isolado de *Botrytis cinerea*. Reta de regressão linear, respetiva equação e coeficiente de determinação (R^2).

No Quadro 12, seguidamente apresentado, encontram-se os parâmetros de regressão linear (R^2 e b) e os valores de CE_{50} obtidos nos ensaio GS9, caso se pudesse aplicar este ajustamento ao modelo.

Quadro 12: Parâmetros de Regressão linear (R^2 e b) e valores de CE_{50} teoricamente registados nos ensaios com o fungo *Botrytis cinerea*, *in vitro*, para 1 mg de proteína e estirpe GS115.

Ensaio	Proteína	R^2	b	CE_{50} (mg L ⁻¹)
GS9	GS C209 EN	0,9797	0,7068	2,75

Uma vez obtidos resultados promissores com o ensaio GS9 (GS C209 EN) e dado que a isoforma C203 é uma subconstrução da C209, utilizou-se secretoma desta construção e aumentou-se a quantidade de proteína inicial para 2,5 mg de modo a verificar possíveis alterações na inibição. Deste modo efetuaram-se os ensaios GS14 e GS15 testando as duas construções mencionadas, teores proteicos mais elevados e fazendo variar a temperatura de incubação para 26 °C (temperatura disponível em ambiente de estufa). O aumento da temperatura não permitiu a obtenção de maiores níveis de inibição (Quadro 11) nem evitou contaminações, pelo que os ensaios subsequentes foram realizados à temperatura ambiente.

Após a série de ensaios com proteínas clonadas na estirpe GS115, a estirpe cuja expressão em metanol se verificou mais elevada no que refere aos dados analisados no

ponto §4.1 (Produção de Secretomas), para 1 mg e 2,5 mg de proteína, alterou-se a estirpe em estudo para a KM71H, mantendo as condições de temperatura dos últimos ensaios. No ensaio KM8 não foram efetuadas medições, visto que para o mesmo período de incubação (3 dias) o crescimento em PDA revelou-se muito rápido, possivelmente devido a um aumento de temperatura, sendo que a inibição foi nula. Esta construção deveria ter sido novamente testada, mas por limitação de proteína em stock e em quantidade, não foi repetido o ensaio.

Os ensaios obtidos não permitiram verificar que 2,5 mg de proteína na solução-mãe tenha sido mais eficaz que 1 mg. Este facto pode dever-se a variações relativas das proteínas no secretoma, donde resulta que nem sempre mais proteína total corresponda a mais quitinase ativa. Seria necessário avaliar a atividade quitinolítica *in vitro* do secretoma, o que não foi feito neste trabalho dada a escassez de proteína e o facto das condições de teste (temperaturas elevadas) não espelharem as condições de utilização da proteína em ensaio biológico.

Os ensaios com a estirpe KM71H não proporcionaram melhores resultados que os realizados com a estirpe GS115. Este facto é aceitável, na medida em que a quantidade de proteína total era igual (devendo ser a quantidade de quitinase ativa semelhante, apesar de ser de admitir variações na composição relativa dos secretomas). A razão da utilização das duas estirpes prende-se com o facto de não se saber, à partida, qual a estirpe mais adequada para expressar quitinases, uma vez que já foi verificado que a eficiência da expressão heteróloga da proteína recombinante (da expressão e das modificações pós-produção) em cada estirpe depende diretamente da proteína a expressar (Invitrogen, 2010). Neste caso, a GS115 permitiu maior acumulação de proteína e a KM71H não revelou nenhum benefício em termos de conformação/eficiência da proteína.

De seguida foram selecionados outros fungos (Quadro 13) para o estudo de inibição micelial, mantendo a quantidade de proteína adicionada na solução mãe, 2,5 mg, a estirpe KM71H, e as condições de temperatura dos últimos ensaios em *B. cinerea*. Para a espécie *I. macrodydima* escolheu-se o isolado Cy244, e selecionou-se a construção KM C209 EN. Por sua vez no isolado de *Stemphylium* sp. testou-se a construção KM C203 EN. Optou-se por estas duas construções por disponibilidade em stock, e uma vez que a isoforma C209 revelara alguma eficácia em *B. cinerea*. A segunda foi selecionada por ser uma sub-construção da anterior.

O ensaio realizado em *I. macrodydima* com a referida construção não proporcionou resultados satisfatórios, com valores de inibição muito baixos na ordem de 6 a 9 %. Por sua vez, a combinação *Stemphylium* sp. / construção KM C203 EN mostrou-se mais eficaz, notando-se algum efeito de inibição do secretoma sobre o crescimento micelial.

Quadro 13: Percentagens de inibição micelial dos ensaios realizados com os fungos *Ilyonectria macrodydima* e *Stemphylium* spp.

PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO MICELIAL (%)		
CONCENTRAÇÕES	25 mg L ⁻¹ Estirpe KM71H <i>Ilyonectria macrodydima</i>	25 mg L ⁻¹ Estirpe KM71H <i>Stemphylium</i> spp.
	KM 7	KM 9
A	8,90	26,94
B	6,30	17,75
C	7,59	14,25
D	7,24	14,25
E	7,24	12,44
F	7,95	8,81

Foram realizados ainda três ensaios com o fungo *V. inaequalis* em que se testaram as construções KM C203 EN repetidamente, com 2,5 mg de proteína à temperatura ambiente. Por ser um fungo de crescimento bastante lento, foi difícil conservar as placas sem a ocorrência de contaminações. Deste modo não foram retirados dados dos ensaios referidos, o que seria de interesse para este projeto.

Em resumo, tendo em atenção os objetivos do trabalho, numa primeira fase escolheram-se as construções mais promissoras. De seguida, procurou-se variar a quantidade de proteína e a temperatura; por fim, variou-se a estirpe onde estava clonada a construção. O esquema seguidamente apresentado (Figura 19), resume a estrutura dos resultados nos ensaios validados para as diferentes condições e fungos em estudo.

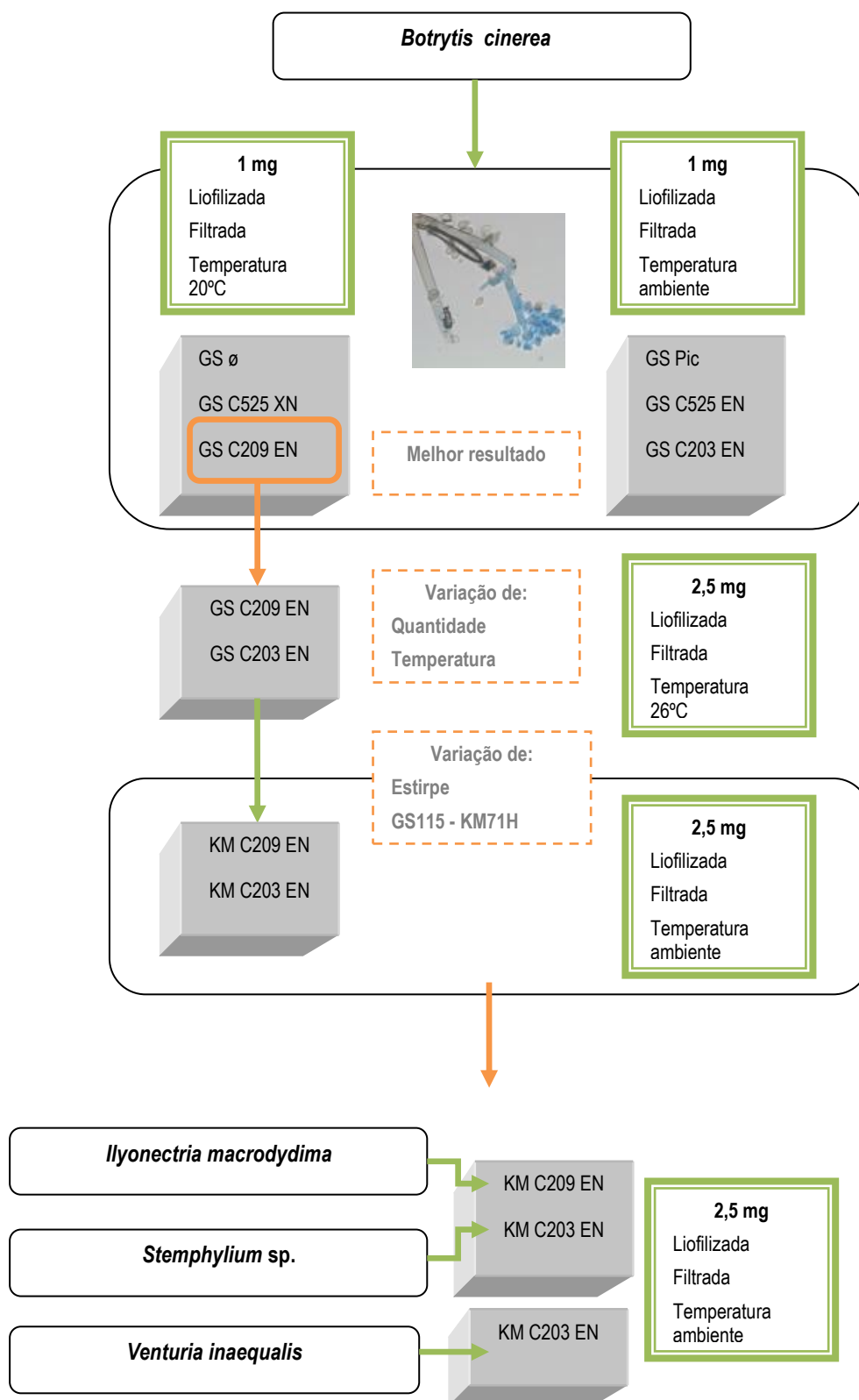


Figura 18: Esquema dos ensaios de inibição micelial válidos

Diversos ensaios *in vitro* sobre fungos demonstraram pouca inibição da quitinase por si só, o que pode indicar que o papel efetivo desta proteína dependa da atividade simultânea de β -1,3- glucanase ou outra substância antifúngica que potencie o seu efeito (Ebrahim *et al.*, 2011), podendo ser esta um dos motivos pelo qual ocorreram percentagens baixas de inibição micelial nas diferentes construções. Por outro lado, os genes de quitinases de macieira testados são do tipo extracelular, aos quais se atribui menor atividade antifúngica que aos de origem vacuolar. Neste contexto, os resultados de fraca inibição na grande maioria das construções vão de encontro com a bibliografia disponível sobre o tema. Ainda assim, os genes estudados apresentam uma estrutura primária muito semelhante à dos genes codificadores de quitinases de *Rhizopus oligosporus*, cuja atividade antifúngica foi comprovada por Terakawa *et al.* (1997) e Yanai *et al.* (1992). Este facto, associado ao de terem origem apoplástica, atuando no início do desenvolvimento do fungo, sugere o interesse da utilização destas proteínas como fungicida de origem vegetal para atuar no início da infeção, mesmo tendo em atenção que as quitinases de classe I, de origem vacuolar, têm obtido melhores resultados em termos de eficácia antifúngica (Ebrahim *et al.*, 2011).

4.2.2 Ensaios de inibição de germinação de esporos

No ensaio de inibição de germinação de esporos efetuado com o fungo *B. cinerea* para a construção GS C209 EN, que se verificou eficaz em ensaios de inibição micelial, não ocorreu germinação de esporos na percentagem necessária às contagens de esporos no tempo estipulado.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS

As quitinases demonstram um imenso potencial de aplicação tanto a nível tecnológico tanto para possível aplicação na agricultura como agente de biocontrolo, devido às suas funções de proteção, nomeadamente na sua ação de degradação da quitina presente na parede celular de diversos fungos fitopatogénicos. Dadas as características de interesse destas proteínas, o objetivo principal deste trabalho consistia na avaliação da eficácia biológica de quitinases de macieira de classe III previamente clonadas em leveduras *Pichia pastoris*.

Para tal foi necessário estabelecer uma metodologia de produção e purificação de secretomas com quitinases. Neste contexto, procurou-se com este trabalho, avaliar o comportamento e a influência de diferentes estirpes de *P. pastoris*, modos de preparação do secretoma na fase pós-secreção, tempos de cultura, isoformas e sinais peptídicos distintos. No crescimento de leveduras em cultura líquida, e tomando partido do uso das diferentes sensibilidades em metanol observou-se que, a estirpe mais eficaz em expressão de proteína extracelular foi a estirpe GS115, com tempos de crescimento em cultura líquida prolongados (120h e 144h). Os baixos valores obtidos sugerem no entanto que talvez *P. pastoris* não seja o sistema de expressão mais adequado para produção em larga escala desta proteína. A maior eficiência verificada em construções do tipo EN (sinal peptídico de *S. cerevisiae*) não permite retirar grandes conclusões, pois para estas isoformas, não se dispunha da construção XN (sinal peptídico da macieira).

O tempo de cultura mais adequado varia de crescimento para crescimento, sendo fundamental a monitorização periódica da evolução das OD_(600 nm) e do teor de proteína solúvel no sobrenadante.

No processamento pós-secreção heteróloga demonstrou-se serem importantes as etapas de diálise, liofilização e filtração dos secretomas. Na produção de secretomas conclui-se que para as mesmas condições de crescimento, o comportamento das leveduras pode ser diverso, possivelmente pela degradação da parede celular da levedura.

Não se chegou a uma conclusão clara sobre a quantidade de proteína que confere inibição, sugerindo-se continuar a iniciar a avaliação com 1 mg de proteína/100 mL de solução mãe.

As condições dos ensaios biológicos dependem fundamentalmente das suas condições de crescimento. No caso presente, ficaram muito limitadas pelos problemas verificados com contaminações exógenas.

Conclui-se que entre todas as amostras de secretomas analisadas em ensaios de inibição micelial, a construção que se revelou mais promissora em ensaios de inibição micelial foi a GS C209 EN (gene C209 clonado em GS115 com sinal peptídico de *S. cerevisiae*) expressa até às 96h. A eficácia foi, ainda assim, baixa quando comparada com a obtida por muitos dos fungicidas aplicados, já que apenas se obteve uma percentagem de inibição máxima de 58%.

Futuramente seria interessante efetuar ensaios que testem a eficácia destes enzimas em mais fungos de interesse, bem como o possível efeito sinérgico com algum fungicida aplicado e inibição de esporos. Propomos ainda a utilização de secretomas da construção mais eficaz em ensaios em planta, de modo a avaliar o tempo de degradação desta proteína no que diz respeito às condições de temperatura e persistência, de modo a inferir sobre possíveis condições de aplicabilidade na prática. Caso estas se verifiquem, uma eventual proteção da proteína com encapsulados que retardem a degradação e permitam uma melhoria da sua eficácia, será uma abordagem a seguir. Seria também interessante elaborar ensaios que visem a eficácia das quitinases ácidas de macieira a nível preventivo e curativo (antes e após infeção na planta), quando houver risco de infeção ou no início do processo da mesma. Uma outra perspetiva a ter em atenção é a avaliação do seu potencial como inseticida, uma vez que os insetos têm também quitina.

Estes ensaios deveriam ser acompanhados de outros trabalhos a nível bioquímico. Será relevante equacionar outro sistema de expressão ou, pelo menos, outra escala de expressão que permita maior acumulação de proteína. Neste contexto, já seria possível proceder a uma caracterização bioquímica das proteínas recombinantes (nomeadamente sua purificação e avaliação da atividade quitinolítica *in vitro*) e eventual utilização de proteína pura, em vez de secretoma, nos ensaios de eficácia biológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcazar-Fuoli L, Clavaud C, Lamarre C, Aïmanianda V, Seidl-Seiboth V, Mellado E & Latgé J (2011) Functional analysis of the fungal/plant class chitinase family in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 418-429.
- Amaro P (2003) A Protecção Integrada. ISA/Press.
- Anke T (1995) The antifungal strobilurins and their possible ecological role. *Canadian Journal of Botany* 73: 940-945.
- Anke T, Oberwinkler F, Steglich W & Höfle G (1977) Antibiotics from basidiomycetes, 1. The striatins - new antibiotics from the basidiomycete *Cyathus striatus* (Huds ex. Pers) Wild. *J. Antibiot* 20: 221-225.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS & Van Loon LC (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47: 79-87.
- BIOCANT (2013) <http://www.biocant.pt/> (acedido em 2/10/2013).
- Bizarro P (2012) Estenfiliose na couve coração-de-boi: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Bliss CI (1934) The calculation of the dosage mortality curve. *Annals of Applied Biology* 22: 135-167.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broggini GAL, Bus VGM, Parravicini G, Kumar S, Groenwold R & Gessler C (2011) Genetic mapping of 14 avirulence genes in an EU-B04 x 1639 progeny of *Venturia inaequalis*. *Fungal Genetics and Biology* 48: 166–176.
- Brunner F, Stintzi A, Fritig B & Legrand M (1998) Substrate specificities of tobacco chitinases. *The Plant Journal* 14: 225-234.
- Brzezinska MS & Jankiewicz U (2012) Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Curr Microbiol.* 65: 666-672.
- Cabral A, Rego C, Nascimento T, Oliveira H, Groenewald JZ & Grous PW (2011) Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology* 116: 62-80.
- Cardoso M (2011) Detecção de fungos do género *Ilyonectria* em viveiro vitícola, Dissertação de Mestrado para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, p. 85.
- Cereghino JL (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 45-66.

- Cohen-Kupiec R & Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 270-277.
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U & Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3: 31-40.
- COMPETE (2013) <http://www.pofc.qren.pt/> (acedido a 2/10/2013)
- Crous PW, Verkley GJM, Grouenewald JZ & Samson RA (2009) Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht, the Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Datta SK & Muthukrishnan S (1999) Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press LLC.
- Desai PN, Shrivastava N & Padh H (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*: 427-435.
- DGADR (2011) Vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal em 2010, Lisboa: DGADR.
- Ding C-K, Wang CY, Cross KC & Smith DL (2002) Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related protein genes and increased resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895-901.
- Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
- Ebrahim S, Usha K & Singh B (2011) Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, Vol. 2: Science against microbial pathogenes : communicating current research and technological advances (ed. by A Mendez-Vilas) Formatex Research Center, pp. 1043-1054.
- Edreva A (2005) Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31: 105-124.
- El-Katatny MH, Somitsch W, Robra K-H, El-Katatny MS & Gübitz GM (2000) Production of Chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food technol. biotechnol.* 38: 173-180.
- Farropas LMT (2003) Estudo de meios de protecção em relação ao pé-negro da videira causado por *Cylindrocarpon destructans*, Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agrónómica: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Finney (1951) Probit analysis. Cambridge Univers. Press, Cambridge (cit. Amaro, 1971).
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P & Chhatpar HS (2006) Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology* 5: 54-72.
- Haggag WM (2002) Induction of hyperproducing chitinase *Trichoderma* mutants for efficient biocontrol of *Botrytis cinerea* on tomato and cucumber plants growing in plastic houses. *Arab J. Biotech* 5: 151-164.

- Halleen F, Schroers H-J, Groenewald JZ & Grous PW (2004) Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*) and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp.). *Studies in Mycology* 50: 431-455.
- Higgins DRC & Cregg J (1998) *Methods in Molecular Biology Pichia Protocols*. The Humana Press.
- Horsfall JC (1956) *Principles of Fungicidal Action*. Waltman, Mass.
- Huynh QK, Hironaka CM, Levine EB, Smith CE, Borgmeyer JR & Shah DM (1992) Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 6635-6640.
- Invitrogen (2010) *Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris*: by Invitrogen, p. 97.
- Iseli B, Armand S, Boller T, Neuhaus JM & Henrissat B (1996) Plant chitinases use two different hydrolytic mechanisms. *FEBS Letters* 382: 186-188.
- IUBMB (2012) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> (acedido em 09/12/2012).
- Joel DM & Portnoy VH (1998) The angiospermous root parasite *Orobancha* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis-related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Ann. Bot* 81: 779-781.
- Kasprzewska A (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8: 809-824.
- Kramer KJ & Muthukrishnan S (1997) Insect Chitinases: Molecular Biology and Potential Use as Biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 887-900.
- Lawton KA, Beck J, Potter S, Ward E & Ryals J (1994) Regulation of cucumber class III chitinase expression. *Mol. Plant-Microbe Interact* 7: 48-57.
- Llorente I & Montesinos E (2002) Effect of relative humidity and interrupted wetness periods on brown spot severity of pear caused by *Stemphylium vesicarium*. *Phytopathology* 92: 99-104.
- McKay AH, Hagerty GC, Follas GB, Moore MS, Christie MS & Beresfor RM (2011) Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) fungicide resistance prevention strategy. *New Zealand Plant Protection* 64: 119-124
- Montesinos E & Vilardell P (1992) Evaluation of FAST as a forecasting system for scheduling fungicide sprays for control of *Stemphylium vesicarium* on pear. *Plant Disease* 76: 1221-1226.
- Morton V & Staub T (2008) *A Short History of Fungicides: by A Features.* APSnet Features., APSnet Features.
- Mota M (2002) *Alternative strategies to fight apple scab*, Tese de Doutorado em Engenharia Agronómica, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

- Olaya G & Köller W (1999) Baseline sensitivities of *Venturia inaequalis* populations to the strobilurin fungicide kresoxim-methyl. *Plant Disease* 83: 274-278.
- Park SM, Kim DH, Truong NH & Itoh Y (2002) Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oriza sativa* L.). *Enzyme Microb Technol* 30: 697-702.
- Patil RS, Ghormade VV & Deshpande MV (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26: 473-483.
- Punja ZK & Zang YY (1993) Plant Chitinases and their roles in resistance to fungal disease. *The Journal of Nematology* 25: 526-540.
- Rego C & Mota M (2013) Principais doenças parasitárias das pomóideias: Manual Bayerfruta: a fitossanidade das pomóideias (ed. by Bayer), pp. 62-69.
- Reis P (2010) Caracterização de fungos do género *Cylindrocarpon* obtidos numa vinha com sintomas de declínio., Dissertação de Mestrado: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, p. 71.
- Reis P, Cabral A, Nascimento T, Oliveira H & Rego C (2013) Diversity of *Ilyonectria* species in a young vineyard affected by black foot disease. *Phytopathologia Mediterranea* 52.
- Rossi GD, Labate MTV, Labate CA, Vinson SB & Cônsoli FL (2012) Characterization of a *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) – derived chitinase and its potential for pest control. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104: 96-102.
- Selitrennikoff CL (2001) Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2883-2894.
- Sharma N, Sharma KP, Gaur RK & Gupta VK (2011) Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian Journal of Biochemistry* 6: 29-37.
- Shepard HH (1951) The chemistry and action of insecticides 1st.ed. edn. McGraw-Hill Book Co.Inc., New York Cit. Tomaz,1958.
- Simões JS (2005) Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura. 1^a Edição edn. Principia, Publicações Universitárias e Científicas, Porto.
- Sousa SH (2011) Produção e Caracterização de quitinases ácidas de macieira em *Pichia pastoris*, Vol. Dissertação de Mestrado: Universidade de Lisboa Faculdade de Ciencias.
- Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M & Takagi M (1997) A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 16: 439-443.
- Tomaz IL (1958) Características fitofarmacêuticas de alguns fungicidas. Métodos de análise, Relatório de Estágio do Curso de Engenheiro Agrônomo: Relatório de Estágio do Curso de Engenheiro Agrônomo, ISA, UTL, Lisboa, p. 175 pp.

- Vaz A (2008) Doenças causadas por fungos *Botryosphaeria* em videira : Caracterização fenotípica e molecular de isolados e sensibilidade a fungicidas., Dissertação de Mestrado: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, p. 74.
- Yanai K, Takaya N, Kojima N, Horiuchi H, Ohta A & Takagi M (1992) Purification of Two Chitinases from *Rhizopus oligosporus* and Isolation and Sequencing of the Encoding Genes. *Journal of Bacteriology* 174: 7398-7406.
- Ypema HL & Gold RE (1999) Kresoxim-methyl, modification of a natural occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Disease* 83: 4-19.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Composição do meio de malte

Composição do meio de malte
25 g de extrato de Malte
4,9 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
6,8 g de $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$
15 g de Agar
1000 mL de água destilada
pH=5

ANEXO 2: Sequências isoladas de DNA genômico das isoformas C525, C203, C209

Sequência de DNA da isoforma C525

ATGGCTTCAAAGTCCACAGCAACGTTCCCTAGCATTGCTCTCTTTAGTGACACTAGTTCTGGCTCTCGGGGC
TAATGCCGGTGAATCGCAATATATTGGGGTCAGAATGGTAATGAAGGCACATTAGGAAACATGTGCTTCA
GGGAATTACCAATTTGTAAACGTAGCTTTTCTCACCACCTTCGGCAACGGCCAAACGCCTGCAATCAACCT
AGCCGGTCACTGTGACCCAACGACAGAAGAATGCACCAAAATAGCCCAGAAATCAAGTCATGCCAAGCCAA
GGGGATTAAAGTCATACTCTCCATAGGAGGAGCTTCTGGGAGCTACTCTCTAACTTCAGCTGATGATGCAA
GGCAAGTTGCAACTTACCTGTGGAAAATTCTTGGGAGGGCAATCGTCGTCGAGGCCATTGGGAGCTGCCG
TTTTGGATGGAATTGATTTTGACATCGAGGGAGGGACTGACCAACATTGGGATGACCTAGCAAGGTACCTC
TCTGGATATACAAAGAGGGCAAGAAAGTTTACTTGACTGCTGCCCCACAATGTCCCTTTCTGATGCTTATGT
TGGAATGCACTTAAGACGGGCCTCTTTGACAATGTTTGGGTTCACTTCTACAACAACCCTCCCGCCATAC
GCTTCTGGGGATGTGACCAACCTTGAAGACGCCTGGAAGCAGTGGACTTCAGCCATCCCTGCAGATAAGA
TTTTCTTGGGATTGCCTGCTGCACCTCAAGCTGCTGGTAGCGGGTTATCCTGCACTGATCTTAGCTCACAA
GTTCTTCCGGCTATTAAGTTTCGGCTAAGTATGGAGGCGTCATGCTTTGGTCCAAGTATTATGATGATCTT
GATGGATACAGCTCCTCCATCAAGAATGATGCTAG

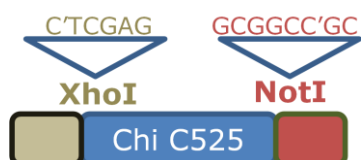
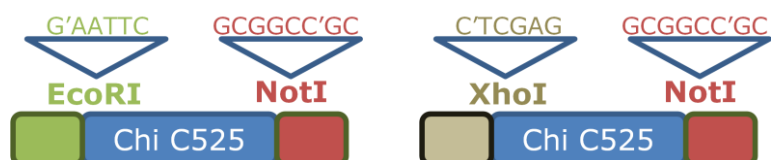
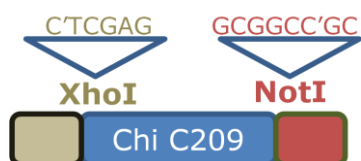
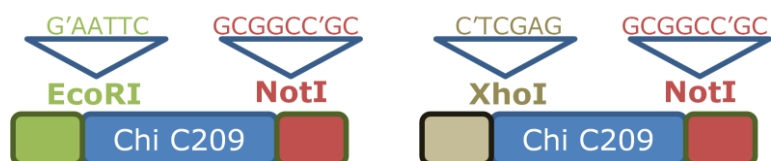
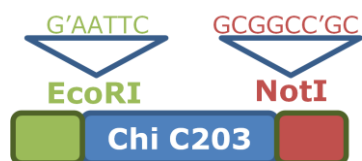
Sequência de DNA da isoforma C203

CCAGAAATCAAGTCATGCCAAGCCAAGGGGATTAAAGTCATACTCTCCAGAGGAGGAGCTTCTGGGAGCT
ACTCTCTAGCTTCAGCTGATGATGCAAGGCAAGTTGCAACTGACTTGTGGAACAACCTTTGGGAGGGCATT
CTCGTCAAGGCCGTTGGGAGCTGCAGTATTGGATGGAATTGACTTTGATATTGAAGGAGGGACTGACCAAC
ATTGGGATGACCTTGCTAAGTACCTATCTGGATATAGCAAGGGGCAAGAAAGTCTACTTGACCGCTGCCCC
ACAATGTCCCTTTCTGATGCTTGGATTGGAATGCACTTAAGACAGGCCTCTTTGACAATGTTTGGGTTCA
GTTCTACAACAACCCTCCCTGTCATAACTCCGGCGACGTGGCCAATCTAGAGGACGCTTGAAGCAGTG
GACTTCAGCCATCCCTGCACATAAGATTTTCTTGGGGTTGCCTGCTGCTCCTCAGGCTGCCGGTAGCGGTT
TTATTCCTGTTTCGATCTCAACTCACAAGTCCTTCCGGCTATTAAGAAATTCGGCTAAGTATGGAGGTGTCATG
CTTTGGTCCAATATTATGATGATCTTGATGGATACAGCTCCTCCATCAAGAGTCATGTCTA

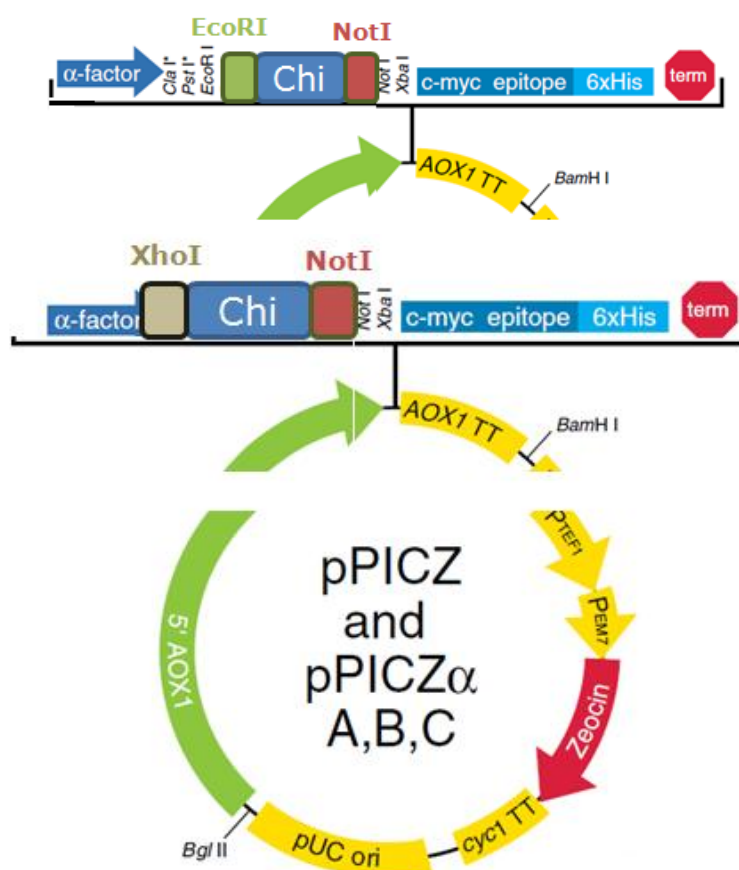
Sequência de DNA da isoforma C209

ATGGCTTCAAAGTCCACAATGTCCCTAGCATTGCTCTCTTTAGTGACACTAGTTCTGGCTTTGGGGGCTAAT
GCCGGTGAATAGCTATATATTGGGGTCAAAATGGGAATGAAGGCACGTTAGCGGACTTGTGCTACAGGG
AATTACCAATATGTAAACGTAGCTTTTCTCACCACCTTCGGCAATGGCCAAACCCCGCCATCAACCTAGCC
GGTCACTGTGTCCCAACGACCGATGAATGCACCAAGTTGGCCAGAGATCAGGTCATGCCAAGCCAAGGGG
ATTAAGGTCATACTTTCCATTGGAGGAGCTTCTGGGAGCTACTCTCTAACTTCAGCAGCTGATGCAAGGCA
AGTTGCAACTTACTTGTGGAACAATTTTGGGAGGGCATTCTGTCGTCGAGGCCATTGGGAGCTGCAGTATTG
GATGGAATTGACTTTGATATTGAGGGAGGGACTGACCAATATTGGGATGACCTTGCTAGGTACCTATCTGG
ATATAGCAGAGGGCAAGAAAGTTTACTTGACTGCTGCCCCACAATGTCCCTTTCTGATGCTTGGATTGGA
AATGCACTTAAGACAGGCCTCTTTGACAATGTTTGGGTTCACTTCTACAACAACCCTCCCTGTAGTAACCTC
CGGCGACGTGGCCAATCTGGAGGACGCTTGAAGCAGTGGACTTCAGCCATCCCTGCACATAAGATTTTC
TTGGGGTTGCCTGCTGCTCCTCAGGCTGCCGGTAGCGGTTTTATTCCGCTTCGATCTCAACTCACAAGTCC
TTTCGGCTATTAAGGCTCGGCTAAGTATGGAGGTGTCATGCTTTGGTCCAAGTATTATGATGATCTTGATG
GATACAGCTCCTCCATCAAGAGTCATGTCTA

ANEXO 3: Representação esquemática das construções, com respetivos locais de restrição: EcoI+NotI e XhoI+NotI (Sousa, 2011).



ANEXO 4: Plasmídeo pPICZ α : construções EN(EcoI+NotI) e XN (XhoI+NotI) (Sousa, 2011).



ANEXO 5: Meios para crescimento de leveduras

Meios para crescimento de leveduras

BMGY e BMMY (Meio Tamponado Complexo com Glicerol/Metanol):

Para BMGY e BMMY

10 g de extrato de levedura

20 g de peptona

700 mL de água destilada

Dissolver os constituintes e autoclavar a 120°C, 1,4 bar durante 20 minutos e após arrefecimento adicionar:

100 mL de YNB 10x

100 mL de tampão Fosfato

100 mL de Metanol 10x (BMMY) / 100mL de Glicerol 10x (BMGY)

2 mL de Biotina 500x

ANEXO 6: Protocolo de preparação das membranas de diálise

Preparação das membranas de diálise
<ul style="list-style-type: none">• Lavar as membranas 3-4 h em água corrente;• Tratar as membranas com a solução de sulfito de sódio, a 80°C durante 1 min;• Lavar com água quente a 60°C durante 2min;• Incubar 2-3 min em solução de ácido sulfúrico;• Lavar com água quente várias vezes para remover o ácido.